

Methoden und Ergebnisse
der
Strahlenhistochemie

Dr. PETER SCHMID

Aus dem Strahleninstitut (Leiter: Priv.-Doz. Dr. H.-J. Maurer) der Universitäts-Frauenklinik
(Direktor: Prof. Dr. R. Dyroff)
Erlangen

Grundlagen
Methoden und Ergebnisse
der
Strahlenhistochemie

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Friedrich - Alexander - Universität
zu
Erlangen



vorgelegt von
PETER SCHMID
Zahnarzt aus Edlhausen

Tag der Mündlichen Prüfung: 3. Dezember 1957

Referent: Priv.-Doz. Dr. H.-J. Maurer

Korreferent: Prof. Dr. R. Dyroff

Dekan: Dr. N. Henning

Meinen lieben Eltern!

Inhaltsverzeichnis

Seite

Allgemeiner Teil:

Einleitung	5
Problemstellung	5
Definition	5

I.	Fixierung:	6
	a) Diffusionsvermögen	7
	b) Eiweißfällung	7
	c) Volumenveränderung	8
	d) H - Ionenkonzentration	8
	e) Temperatur	8
	f) Fixierungsmethoden der enzymatischen Histochemie	9
II.	Färbung:	10
	a) Physiko-chemisches Verhalten der Farbstoffe im Gewebe	11
	b) Chemische Färbetheorie	11
	c) Die elektrischen Faktoren der Farbstoffe	11
	d) Verschiedene histochemische Färbemethoden und ihre Prinzipien	11
III.	Enzymatische Histochemie	17
IV.	Quantitative Färbemethoden	18
V.	Strahlenwirkung auf biologische Systeme	20

Spezieller Teil:

Ergebnisse und Methoden der Histochemie unter Strahleneinfluß bei: . . .	27
--	----

I.	Nucleinsäuren (NA) Ribonucleinsäuren (RNA) und Desoxyribonucleinsäuren (DNA)	29
II.	Sulfohydryl	42
III.	Enzyme	45
IV.	Mastzellen	48
V.	Knochenmark	49
	Zusammenfassung	52
	Literaturverzeichnis	53

Allgemeiner Teil

Einleitung

Der englische Botaniker Robert HOOKE beschreibt in seiner „Mikrographia“ (1665) Waben und Kästchen, die er an Schnitten von Kork- und Holundermark beobachtete und nennt sie selbst „Cells“. Seit dieser Entdeckung hat sich eine Vielzahl von Forschern mit Morphe und Struktur der Zellen beschäftigt. 1774 sah CORTI an lebenden Zellen den Inhalt, den H. v. MOLL 1846 als Protoplasma bezeichnete. Der Zellkern wurde 1831 durch R. BROWN erstmals beschrieben. 1839 stellte Theodor SCHWANN die Zelltheorie auf, in der er zum Ausdruck bringt, daß alle Lebewesen, Pflanzen und Tiere, aus Zellen aufgebaut sind. 1858 bezeichnet Rudolf VIRCHOW in seiner „Zellulärpathologie“ die Zelle als das letzte Formelement aller lebendigen Erscheinungen, sowohl im Gesunden wie Kranken. Heute wird die Zelle als morphologische und funktionelle Grundeinheit der höheren Lebewesen angesprochen, wobei in diesem Falle unter höheren Lebewesen bereits die Einzeller (Protozoen) verstanden werden, da auch nichtzellige Lebewesen, Bakterien und Viren, bekannt sind (VOSS, 180). Nachdem Morphe und Struktur der Zelle eingehend studiert waren, interessierte vor allem ihr chemischer Aufbau. In jüngster Zeit konnten mit Hilfe der Histochemie, insbesondere ihrer speziellen Methoden, große Fortschritte erzielt werden.

Mit der Entdeckung der Röntgenstrahlen (1895), der Radioaktivität (1896), des Radiums (1898) und der künstlich radioaktiven Isotope (1934) wurden u. a. für die Medizin wichtige diagnostische und therapeutische Möglichkeiten geschaffen. Ebenso wichtig wie die nutzbare Anwendung dieser neu entdeckten Strahlen war die systematische Untersuchung der bio- und histochemischen Veränderungen nach Einwirkung der durchdringenden Strahlen auf den Organismus, um Einblicke in den Reaktionsablauf nach der Einwirkung ionisierender Strahlen zu bekommen und schließlich u. U. daraus einen Strahlenschutz zu entwickeln. Letzteres hat gerade im Hinblick auf die zunehmende Anwendung der radioaktiven Substanzen in der Energiewirtschaft, in der Medizin usw. eine ganz besonders große Bedeutung.

Problemstellung

Die vorliegende Arbeit soll an Hand der Literatur Grundlagen, Methoden und Resultate auf dem Gebiet der Histochemie unter besonderer Berücksichtigung ihrer Anwendung bei der Untersuchung während und nach der Einwirkung ionisierender Strahlen aufzeigen.

Definition

Zunächst erhebt sich die Frage: was ist Histochemie? Die Histochemie untersucht mit bestimmten Methoden bekannte chemische Substanzen in Verbindung mit den Bestandteilen der Zelle und den Formelementen des Gewebes nicht nur unter normalen Bedingungen, sondern auch deren Beziehung zueinander nach dem Einfluß verschiedenster Noxen, (z. B. ionisierende Strahlen). Die histochemische Methodik

versucht also, Momentbilder aus den Abläufen chemischer Reaktionen im Gewebe festzuhalten, während die reine Histologie nur den Nachweis morphologischer Strukturen zum Ziel hat. HORNYKIEWYTSCH (77) u. SEYDEL sagen in diesem Zusammenhang: „Genau wie jede chemische Reaktion gliedert sich auch eine histochemische Untersuchung in einen qualitativen (bis jetzt meist als Histochemie bezeichnetes Verfahren) und einen quantitativen Nachweis der zu untersuchenden Substanz. Beim qualitativen Arbeiten kommen, da hierbei eine Trennung von einem histologischen Schnitt als Substrat oft nicht möglich ist, nur solche Verfahren und solche Reagenzien in Betracht, die imstande sind, im Gewebe spezifische Farbreaktionen mit einem destillierten Stoff zu geben. Der quantitative Nachweis dagegen bedient sich der präparativen Methoden, wie sie in der Biochemie üblich sind. Da jedoch in der Histochemie als oberstes Gesetz die Zuordnung einer chemischen Substanz an die bestimmten Formelemente gilt, müßten in diesem Fall, um die Zusammenhänge zu wahren, gleichzeitig die üblichen histologischen Methoden angewandt werden. Auch bei einem qualitativen Vorgehen erscheint uns die Herstellung normaler histologischer Schnitte angezeigt. Es ist selbstverständlich, daß dabei so verfahren werden muß, daß möglichst aufeinanderfolgende Schnitte einer histochemischen und einer histologischen Auswertung zugeführt werden“. Es erschien daher von größter Wichtigkeit, zunächst die bekanntesten Fixierungs-, Färbungs- und quantitativen Bestimmungsmethoden der Histochemie zu besprechen.

I. Fixierung

Da sich lebende Gewebe nach der Entnahme aus dem Organismus sehr bald stark verändern, ist es eine Hauptaufgabe der Mikrotechnik, die postmortalen Vorgänge möglichst auszuschalten und die Struktur der Gewebe in einem dem ursprünglichen Zustand möglichst getreuen Abbild zu fixieren. Man bedient sich dazu in den meisten Fällen der Einwirkung bestimmter Lösungen (Fixierungsflüssigkeiten). Bei der Betrachtung fixierter Präparate muß stets bedacht werden, daß etwa 80% der lebenden Substanz aus Wasser, 12% aus Eiweißkörpern und 7% aus Fetten bzw. fettähnlichen Stoffen bestehen und daß der größte Teil der Trockensubstanz zur Zeit des Lebens in gelöstem Zustand vorliegt. Der Vorgang der Fixierung ist also auch bei bester Technik notgedrungen mit einer mehr oder weniger eingreifenden Zustandänderung verknüpft; dabei werden allerdings nicht alle Bauelemente des Organismus in gleichem Maße verändert. Es gibt keine Fixierungsflüssigkeit, durch die sich alle Zell- und Gewebestandteile gleich gut erhalten ließen. Infolgedessen ist es bei eingehenden Untersuchungen immer notwendig, mit mehreren Flüssigkeiten zu arbeiten. Wenn eine Flüssigkeit eine Organart gut fixiert, so ist damit noch nicht gesagt, daß sie deshalb auch bei einer anderen den gleichen Erfolg hat. Die Fixierarbeit kann sich je nach dem physiologischen Zustand der einzelnen Zellen, sogar bei den Zellen ein- und desselben Gewebes innerhalb eines Tieres, verschieden verhalten. Jede Fixierungsflüssigkeit kann daher zu anderen Beobachtungen führen.

a) Diffusionsvermögen

Eine wichtige Rolle in der Fixierungstechnik spielt das Diffusionsvermögen der verschiedenen Flüssigkeiten. So diffundieren z. B. Platinchlorid, Osmisäure, Pikrinsäure nur sehr langsam, Trichloressigsäure, Formol und Essigsäure verhältnismäßig schnell. Osmiumsäure (1%) an Leberstückchen zeigt in 4 Stunden nur eine Tiefenwirkung von 0,5-1 mm, konzentriertes Formol dagegen eine solche von 4-5 mm.

(TELLYESNICZY 175). Bei der Anwendung von Fixierungsgemischen eilen die rascher diffundierenden Komponenten den anderen voraus, sodaß in den einzelnen Zonen eines Präparates schon aus diesem Grunde sehr verschiedene Fixierungsbilder entstehen können. So wird z. B. an einem in Chrom-Osmium-Essigsäure fixierten Präparat im Inneren hauptsächlich eine Essigsäurewirkung und nur in den Randzonen die Wirkung der Osmiumsäure beobachtet. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Fixierungsformen machen sich hauptsächlich an den feineren Zellstrukturen bemerkbar. Eine wertvolle tabellarische Zusammenstellung der Diffusionsschnelligkeit verschiedener Fixierungsflüssigkeiten gibt TELLYESNICZKY.

SEKI (202) untersuchte die Diffusionsgeschwindigkeit einiger nichtwässriger Flüssigkeiten und fand folgende Reihenfolge: Methylalkohol, Äthylalkohol - Eisessig., Äthylalkohol - Eisessig - Chloroform Äthylalkohol, Aceton Dioxon Propylalkohol; die Geschwindigkeit hängt von Viskosität, Dielektrizitätskonstante, Dipolmoment und u. A. auch vom pH ab. Außerdem ist das Diffusionsvermögen nicht nur von der benutzten Lösung, sondern auch von der strukturellen und funktionellen Beschaffenheit des zu fixierenden Organs abhängig.

b) Eiweißfällung

Weiterhin ist die Fällung der Eiweißkörper ein nicht zu vernachlässigender Faktor bei der Fixierung, da sie je nach Art und Zusammensetzung des Fixierungsmittels verschieden ausfällt. In neuerer Zeit brachten eine Reihe von Arbeiten wertvolle Aufschlüsse über die Wirkung der Fixierungsflüssigkeiten, namentlich auf das Strukturbild des Kernes. PISCHINGER (142), der neben Untersuchungen an Zellkernen auch Modellversuche mit Nucleinsäuren und Histonen ausführte, konnte dabei vier Gruppen von „Fixantien“ unterscheiden. Den vitalen Charakter erhielt am besten z. B. Osmiumsäure. Alle Essigsäure enthaltenden Gemische erzeugten eine typische Gerüststruktur und Membran der Kerne; die Nucleinsäuren werden dabei entladen, dehydratisiert und unter gleichzeitiger Schrumpfung in Gerüstform ausgeflokt. Die histonreichen Komponenten werden dagegen gelöst. Die Fixierungsflüssigkeit vermag also neben einer fällenden auch eine auflösende Wirkung auszuüben, der die verschiedenen Gewebskomponenten, wie Eiweißkörper, Fette, Lipoide, Kohlehydrate, Salze in wechselndem Ausmaß unterliegen.

c) Volumenveränderung

Nicht zuletzt ist mit dem Vorgang der Fixierung auch eine Volumenveränderung verknüpft, die sich an den einzelnen Bauelementen wie auch an der Gesamtgröße und Gestalt des Präparates bemerkbar macht. Meistens kommt es zu einer Schrumpfung, in anderen Fällen u. A. auch zu einer Quellung. Das Ausmaß der Veränderung ist je nach Organ, dessen chemisch-physikalischem Zustand je nach Fixierungsflüssigkeit verschieden groß. Die Zellen können sich, wie WERNER am Innenohr zeigte, sogar innerhalb ein- und desselben Organes verschieden verhalten, indem die einen schrumpfen, die anderen quellen. Die Schrumpfung kann bei der der Fixierung folgenden Nachbehandlung noch erheblich zunehmen, sodaß sie schließlich nach Paraffineinbettung zwischen 20-40 %, bezogen auf die ursprüngliche Größe, beträgt. Am geringsten ist die Schrumpfung, (wenn auch Nachbehandlung einschl. Paraffineinbettung mitberücksichtigt wird) bei Verwendung von essigsaurem Formol-Alkohol (11%), BOUT'scher Flüssigkeit (18,5%) und TELLYESNICZY'scher Flüssigkeit (19%), (wie PATTEN (149) und PHILOTT an Achweinesembryonen zeigen konnten). Auch nach Fixierung in verdünntem Formol, die anfangs nur eine Quellung von 5% bewirkt, kommt es im Laufe der Nachbehandlung zu einer Schrumpfung von 20-25%.

d) H-Ionenkonzentration

Eine bedeutende Rolle spielt die H-Ionenkonzentration der Fixierungsflüssigkeit. Nach ZIRKLE (193) bestehen zwischen Fixierungsergebnis und aktueller Azidität der Fixierungsflüssigkeit enge Beziehungen; er unterscheidet zwischen sauren (1) und alkalischen (2) Fixationsbildern. (1.) Chromatinnetz, Nucleolen, Chromosomen und Spindelfasern sind gut, Mitochondrien und Cytoplasmen schlecht erhalten, (2.) in diesem Fall ist es umgekehrt. Der Übergang von dem einen zum anderen Bild erfolgt bei einem bestimmten pH, das für die einzelnen Flüssigkeiten verschieden groß ist. Zu berücksichtigen ist, daß sich das pH der Flüssigkeiten im Laufe der Fixierung sowohl durch chemische Umsetzungen ihrer Komponenten wie unter dem Einfluß des Präparates beträchtlich ändern kann. Versuche, die Fixierungsflüssigkeit mit Pufferlösungen auf den normalen pH-Wert der Körpersäfte (Blutserum pH 7,2) einzustellen (z. B. GROSS (61) und LOHAUS) sind nach WERNER abzulehnen, da sie auf falschen Voraussetzungen beruhen; optimale Bilder werden im sauren Gebiet (etwa bei pH 4) erzielt.

e) Temperatur

Die Frage, bei welcher Temperatur die Fixierung am besten vorgenommen wird, wird im Schrifttum sehr verschieden beantwortet. Daß dieser Faktor nicht belanglos ist, ergibt sich aus neueren Versuchen von WERNER (203) am Innenohr. Eine kalte Fixierung (1-10° C) hatte eine Schrumpfung der Epithelien, Zellkerne und Deckgebilde sowie Beschädigungen des Otolithen z.T. bis zum völligen Verlust, zur Folge. Bei ca. 37° C sind die Epithelien dagegen wesentlich höher und die Otolithen vollständig erhalten. WERNER (185) hält daher nur die Fixierung bei Körpertemperatur für

einwandfrei. Im Gegensatz zu obigen Ausführungen steht die Fixierung bei niedriger Temperatur (0-6° C), die namentlich von POLICARD (144) empfohlen wurde; er fand daß dabei die Struktur, selbst bei größeren Organstücken erheblich besser erhalten bleibt als bei Fixation mit warmer Flüssigkeit; dies soll zum größten Teil auf dem Stillstand autolytischer Prozesse beruhen. Auch von amerikanischen Autoren wurde die Fixierung bei niedrigen Temperaturen empfohlen (z. B. HANCE).

f) Enzymatische Histochemie

In Bezug auf die enzymatische Histochemie sagt DUSPIVA (42): „Allgemein gültige Angaben über ein zufriedenstellendes Fixierungsmittel lassen sich noch nicht machen. Man fixiert Gewebeproben „im Stück“ oder fertigt aus lebendfrischem Gewebe Gefrierschnitte an, die schon beim Auftauen auf geeignete Weise fixiert werden müssen. Chloroform fixiert Gewebsstrukturen stets sehr schlecht. Alkohol (80-90%) oder Aceton (absolut) fixieren nicht gerade gut, aber meist ausreichend, sie verursachen keinen allzu starken Aktivitätsverlust, wenn sie eiskalt angewendet werden und ihre Einwirkungszeit 18-24 Stunden nicht übersteigt. Formaldehyd fixiert nicht schlecht und erhält auch die Aktivität zahlreicher Enzyme, geeignet 10%-iger mit Phosphat auf pH 7 gepufferter Formaldehyd, der bei 4° 2-4 Stunden lang angewendet wird“. SELIGMANN (157) (zit. n. CHAUNCEY H. H. u. M. M. Nachlaß: Stain Technol. 26,19 (1951) DANIELLI (204) exp. Biol. 22,110 (1946) hat mit einem Gemisch von 25 Vol.% Pyridin in 80%-igem Alkohol gute Erfahrungen gemacht. Er empfiehlt für die Untersuchungen der alkalischen Phosphatasen ganz besonders ein Gemisch von 20% Pyridin, 70% Alkohol und 10% Formaldehyd (40% ig) bei einer Anwendungsdauer von 2 Stunden. Quecksilber (II)-Chlorid, Trichloressigsäure, Essigsäure (mehr als 1%-ig) zerstören in den meisten Fällen die enzymatische Aktivität völlig. Eine gute Fixierung des Gewebes und Erhaltung der enzymatischen Aktivität sind in gewisser Hinsicht Gegensätze, die nicht überbrücken, sondern nur durch ein Kompromiß lösen lassen. Gewebstücke werden nach der Fixierung bei Zimmertemperatur entwässert und über Xylol in geschmolzenes Paraffin eingebettet. Diese Prozedur bis zur Herstellung der Paraffinschnitte schädigt aber die enzymatische Aktivität stets sehr stark; LISON nimmt z. B. bei der alkoholischen Phosphatase eine Aktivitätsverminderung von 75% an. Es erscheint daher vorteilhaft, alle Stufen möglichst kurzfristig durchlaufen zu lassen und die Einbettungstemperatur nicht höher als 54° zu wählen; diese Empfehlungen haben jedoch nicht für alle Enzyme Geltung. Empfindliche Enzyme z. B. können nur in Gefrierschnitten aus lebendfrischem Gewebe untersucht werden. Zur Herstellung derartiger Schnitte ist das Kryostatmikrotom (LINDERSTRÖM-LANG und MOGENSEN) (205) am besten geeignet. Um eine Verlagerung wasserlöslicher Stoffe der Zellen beim Auftauen der Gefrierschnitte zu vermeiden, ist es angebracht, die Gefrierschnitte in gefrorenem Zustand zu trocknen; dies kann beispielsweise im Kryostaten bei tiefer Temperatur geschehen, wenn ein passendes Trocknungsmittel (z. B. P₂O₅) in den Kryostaten Raum eingebracht wird. Die Schnitte sind dann in 1-2 Stunden trocken.

Manchmal kann es vorteilhaft sein, die Gewebeprobe in Toto durch Gefriertrocknen zu entwässern (freezing-drying), anschließend in ein geeignetes Medium einzubetten und zu schneiden. Das Prinzip dieser Methode beruht auf einem sehr schnellen Einfrieren der Gewebeprobe bei (-180°) in einem Kältebad (Isopentan in flüssigem Stickstoff) und rascher Entwässerung des gefrorenen Materials im Hochvakuum; der Hauptvorteil besteht in einer augenblicklichen Sistierung des Stoffwechsels; ferner ist die Gefahr einer Verschiebung von Enzymen und diffusiven Stoffen auf ein Minimum beschränkt. Cytoplasmatische Einschlüsse werden oft auch strukturell so gut wie nach Fixierung mit eiweißfüllenden Lösungen erhalten. Ein weiterer Vorteil besteht darin, daß die direkte Einbettung der getrockneten Probe in geschmolzenes Paraffin, die im Vakuum vor sich gehen muß, möglich ist. Diese Methode geht auf ALTMANN (1) zurück und wurde später von GERSH erweitert. Einen für histodiernische Zwecke geeigneten Gefrierungsapparat haben PACKER (133) und SCOTT beschrieben. Es herrscht allerdings auch jetzt noch eine geteilte Meinung darüber, ob die Aktivität der Enzyme in den fertigen Paraffinblöcken erhalten bleibt oder nicht. LISON (112) empfiehlt daher, die Gewebeprobe möglichst innerhalb zweier Tage von der Fixierung bis zum fertigen gefärbten Präparat aufzuarbeiten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die vorher beschriebenen Faktoren wie Diffusionsvermögen, Fällung der Eiweiße, Volumenänderung, Quellung, Schrumpfung, H-Ionenkonzentration sowie Temperatureinfluß bei der „Fixierung“ von Präparaten durch die verschiedensten Fixationslösungen sowohl für die Beurteilung von histologischen wie histochemischen Präparaten von ausschlaggebender Bedeutung sind. Es sind infolgedessen tatsächlich nur Ergebnisse, die unter gleichen Fixationsbedingungen gewonnen werden, miteinander vergleichbar. Die Fixierung und Vorbehandlung der Präparate ist nicht nur für die endgültige Beurteilung der Präparate, sondern auch für die Haltbarkeit der Färbung von größter Wichtigkeit.

II. Färbung

Die Erkenntnis, daß bestimmte Bestandteile der Zelle und der Gewebe gewisse Farben mit größerer Intensität aufnehmen und festhalten als andere, war für Histologie wie Histochemie von gleich weittragender Bedeutung. Erst dadurch gelang es, zahlreiche Strukturen und chemische Elemente in den Zellen und Geweben sichtbar zu machen, scharf hervorheben und mühelos voneinander zu trennen. Die Anwendung der Farbstoffe beruht in der histologischen Technik zum größten Teil auch jetzt noch auf rein empirischer Grundlage, da es trotz zahlreicher Untersuchungen noch nicht gelungen ist, das Wesen und die Bedingungen des histologischen Färbungsprozesses klarzustellen. Während sich vor einiger Zeit die chemische Theorie: Färbung durch Salzbindung oder durch Zustandekommen chemischer Additionsverbindungen, großer Anhängerschaft erfreute, treten gegenwärtig vor allem physikochemische Erklärungsversuche in den Vordergrund. Unter den physikalischen Faktoren spielen Diffusionsgeschwindigkeit und Konzentration der Farblösung sowie die Strukturdichte (Porengröße) des Objekts

für die histologische Färbung zweifellos eine große Rolle. Ihre Bedeutung wurde schon 1899 von S. FISCHER in grundlegenden Modellversuchen gezeigt. Später wurde die Diffusionsgeschwindigkeit der Farblösungen namentlich von v. MOLLENDORF (125) und seiner Schule (1923-25) als Versuche der Farbstoffverteilung im histologischen Präparat in Betracht gezogen.

a) Physiko-chemisches Verhalten von Farbstoff im Gewebe

Auf Grund des physiko-chemischen Verhalten von Farbstoff im Gewebe unterscheidet v. MOLLENDORF (206) zwischen Durchtränkungs-färbung und Niederschlagsfärbung. Bei der Durchtränkung, der alle Strukturen zugänglich sind, kommt es zu einer völligen Durchdringung der Strukturen mit dem gelösten Farbstoff. Saure Farbstoffe geben nur Durchtränkungs-färbungen, die basischen können außerdem auch Niederschlagsfärbungen geben (v. MOLLENDORF). Die Niederschlagsfärbung ist ein Oberflächenphänomen, das nur an gewissen Gewebestrukturen auftritt. Sie beruht auf einer Auflockerung der basischen Farbstoffe an der Oberfläche dieser Strukturen in Gegenwart von kolloiden Säuren: z. B. Färbungen der Kerne der Mastzellkörner, des Knorpels, des Schleimes (v. MOLLENDORF). PISCHINGER lehnte eine grundsätzliche Unterscheidung zwischen Durchtränkungs- und Niederschlagsfärbung ab, da sich in seinen Versuchen für eine oberflächliche Farblokalisation in Form von Farbstoffen keine Anhaltspunkte finden ließen: JÄGER (80) bestätigte diese Beobachtungen PISCHINGERS.

b) Als extremer Vertreter einer chemischen Färbetheorie gilt UNNA. Nach UNNA sind alle Färbungen in ihrem Anfang rein physikalische Vorgänge, bei denen der in Lösung befindliche Farbkörper in die gröberen und feineren Poren des Gewebes eindringt und sich hier nach physikalischen Gesetzen (Kapillarität, Oberflächenanziehung u. a.) verteilt und anhäuft. Auf diese schon in wenigen Minuten erreichte erste Phase folgt eine zweite, die eigentliche, einen rein chemischen Vorgang darstellende Färbung.

c) Eine sehr große Rolle spielen ohne Frage auch die elektrischen Eigenschaften der Farbstoffe wie der Substrate. 1905 erbrachte BETHE den Nachweis, daß der Säure- und Alkaligehalt der Farblösung von wesentlichem Einfluß auf das Färbeergebnis ist. Die Gewebelemente verhalten sich dabei verschieden, sodaß es gelingt, bestimmte Strukturen bei einer für sie charakteristischen H-Ionenkonzentration mehr oder weniger elektiv darzustellen. Diese Versuche bildeten die Grundlage für eine elektrostatische Auffassung des Wesens der histologischen Färbung, die jetzt vor allem von Keller, GICKELHORN, NAYLOR, PULCHER, PISCHINGER, ZEIGER u. a. zit. n. 111 vertreten wird. Ausgehend von den Erfahrungen älterer Autoren (BETHE 1905, J. LOEB, 1924 u. a.) hat zunächst PISCHINGER (1926 27) die Färbung histologischer Präparate mit gepufferten Farbstofflösungen technisch und theoretisch soweit fundiert, daß die mit Hilfe dieser Färbemethode gewonnenen Ergebnisse wertvolle Rückschlüsse erlauben. Unabhängig von PISCHINGER haben auch NAYLOR (1926), ROBBINS (1926) und PULCHER (1927) ähnliche Vorstellungen entwickelt. Die Pufferfärbung ist kein

histochemischer Nachweis im eigentlichen Sinne des Wortes (W. LIPP, 1954 (111)). Die von dieser Methode gelieferten Ergebnisse beruhen auf gewissen physiko-chemischen Eigenschaften der histologischen Substrate. Die Pufferfärbung gibt ungefähr Auskunft über die Veränderungen, welche die elektrostatische Gesamtladung einer histologischen Struktur (bzw. der die aufbauenden Substanzen) erleidet, wenn der Säuregrad des sie umgebenden wäßrigen Milieus geändert wird. Aus diesen Veränderungen läßt sich der Grad der „Basophilie“ oder „Acidophilie“ der untersuchten Gewebsstruktur, bei Eiweißkörpern auch die ungefähre Lage ihres isoelektrischen Punktes, ermitteln. Die Kenntnis dieser Charakteristika ermöglicht es, die weitere histochemische Analyse in bestimmte Bahnen zu lenken und kann Hinweise auf Veränderungen geben, welche die Gewebsbestandteile z. B. bei experimentellen Eingriffen erlitten haben. Bei der Auswertung von Pufferfärbungen muß immer bedacht werden, daß die Färbungsinintensität eine Funktion des Substrates sowie der Art der Behandlung des Gewebes vor und nach der Färbung und der Färbungsbedingungen ist. Die die Pufferfärbung beeinflussenden Faktoren sind: Gewebelixierung, Strukturdichte, Natur der Farbstoffe, Farbstoffkonzentration, Ionenstärke und Temperatur der Farblösung, außerdem noch Natur der Farbstoffbindung und Nachbehandlung der Präparate.

Aus den vorangegangenen kurzen Ausführungen entnehmen wir in Übereinstimmung mit Romeis (208) daß die Theorien über das Wesen der Färbung bis in die jüngste Zeit noch vielfach unvereinbar differieren. Aus dem Widerstreit der beigebrachten Befunde ergibt sich immer mehr, daß der Vorgang der histologischen Färbung so komplexer Natur ist, daß sich für ihn wohl überhaupt keine allgemein gültige, sein ganzes Wesen umfassende Theorie aufstellen läßt.

III. Nachweis spezieller Substanzen

Im folgenden werden einige der wichtigsten histochemischen Methoden im Prinzip beschrieben:

Zum Nachweis der **Aminosäuren** wurde die Ninhydrinreaktion von BERG (1922, ROMIFU (1925), GIROUD (1929), SERA und QUIPROZLOPES (1945) u. a. in ihrer Form als „Eprouvettenmethode“ fast unverändert an histologischem Material verwendet. Diese originale biochemische Methode ist genau wie die Alloxan-Reaktion zum Nachweis von α -Aminosäuregruppen für histochemische Zwecke ungeeignet, da die genaue Lokalisierung von freien α -Aminogruppen nicht gewährleistet ist. Die Alloxan-Reaktion ist unspezifisch (ROMIFU, 1925): sie erfolgt möglicherweise auch mit Sulfhydrylgruppen und ist bei fixiertem Material wenig empfindlich (SERA, 1946).

Eine einwandfreie spezifische Methode zum Nachweis von α -Aminogruppen liegt in der Ninhydrin-Schiff-(NS)-(Alloxanschiff) AS-Reaktion nach JASUMA und ICHIKAWA (1953) vor: sie stellt eine moderne Variante der Ninhydrin- (bzw. Alloxan) Reaktion zum Nachweis von α -Aminosäuregruppen in Proteinen und Polypeptiden dar und vermindert die Möglichkeit von Diffusionsartefakten: Ninhydrin (oder Alloxan) wird

nur zur oxydativen Aufspaltung von freien α -Aminosäuregruppen benützt. Aus einer α -Aminosäure entstehen bei dieser Reaktion ein Aldehyd, Kohlendioxyd und Ammoniak. Der Aldehyd, dessen Bildung allerdings nicht regelmäßig erfolgt, bleibt mit dem Protein- bzw. Polypeptidmolekül, dem die Aminosäuregruppe entstammt, verbunden und ist stabil (R. ABDERHALDEN, 1938).

Als zweiter Schritt der NS- (AS-) Reaktion werden die gebildeten Aldehydgruppen mit SCHIFF'schem Reagenz (Leukofuchsin, fuchsinschwefelige Säure) durch Bildung des bekannten Farbstoffkomplexes histochemisch dargestellt. Eine positive Reaktion wird durch rot-violette Färbung angezeigt.

Zur Feststellung der aromatischen Aminosäuren steht die Xanthoproteinreaktion zur Verfügung, die in Proteinen die Anwesenheit der aromatischen α -Aminosäuren, Tyrosin, Phenylalanin und Tryptophan anzeigt; doch ist diese Reaktion nicht spezifisch. In jüngster Zeit wird jedoch stattdessen die Diazonium-Kupplungsreaktion (=Diazoreaktion) angewandt; sie erfaßt in Proteinen Tyrosin (p-Oxyphenylalanin), Histidin (β -Imidazolalanin) und Tryptophan (β -Indolylalanin). Die Reaktion wurde zunächst von LISON, 1931 histochemisch angewendet, später u. a. von SERA 1946 modifiziert, von DANIELLI 1947, 1950 weiter ausgebaut und 1953 von LISON wieder erneut bearbeitet. Für die Spezifität dieser Reaktion fehlt noch ein Beweis. LISON (1931) und SERA (1946) sind der Ansicht, daß in Proteinen nur Tyrosin und Histidin eine positive Kupplungsreaktion geben. Es kann aber angenommen werden, daß auch Tryptophan erfaßt wird. Es wurde ferner vermutet, daß die heterocyklischen Gruppen in Purinen und Pyrimidinen ebenfalls positiv reagieren; PEARSE (1953) stellte fest, daß diese nicht ausreichend nachgewiesen wäre.

Prinzip:

Wirkt salpetrige Säure in der Kälte auf Salze primärer aromatischer Amine (z. B. Sulfanilsäure) ein, entstehen Diazoniumverbindungen. Diese Verbindungen können sich mit primären, sekundären und tertiären aromatischen Aminen, mit Phenolen und Phenoläthern (auch mit einigen ungesättigten aliphatischen und aromatischen Kohlenwasserstoffen) unter Bildung gefärbter Azoverbindungen umsetzen: Kupplungsreaktion der Diazoniumsalze unter Farbstoffbildung. Positive Reaktion wird durch orange oder gelbe Färbung angezeigt. Diese ist einige Tage haltbar.

Der Nachweis von **Arginin und Arginin enthaltenen** Proteinen nach SERA 1944 abgewandelt und modifiziert nach BAKER 1944-47, THOMAS, 1950, LIEBMANN 1951, WARREN und Mc. MANUS (1951) sowie CARVER, BROWN, THOMAS (1953) ist eine histochemische Methode, die auf der Arginin-Farbreaktion mit α -Naphthol beruht (SAKAGUCKI).

Arginin, eine leicht wasserlösliche, basisch reagierende Aminosäure, ist ein Bestandteil vieler natürlich vorkommender, besonders basisch reagierender Proteine. Nach SERA ist diese Reaktion für Guanidin-derivate spezifisch, in denen ein Wasserstoffatom einer oder beider Aminogruppen durch ein Alkyl-Fettsäureradikal etc. ersetzt ist. Die Intensität der Farbreaktion kann „halbquantitativ“ ausgewertet werden.

Prinzip:

Im alkalischen Milieu bildet Arginin mit α -Naphthol und Hypobromit oder Hypochlorid eine orange-rot gefärbte Verbindung. Jeder Überschuß an Hypochlorid oder Hypobromit zerstört den schon gebildeten Farbstoff (MACFHERSON, 1942). Gewöhnlich wird im Reaktionsgemisch Farbstoff zugesetzt, um einen Überschuß aufzunehmen. Die Farbreaktion ist nicht haltbar.

Zur histochemischen Darstellung von **Tyrosin** steht die Millon-Reaktion zur Verfügung. Tyrosin ist eine in natürlichen Proteinen häufig enthaltene aromatische α -Aminosäure. Der relative Tyrosingehalt (LIPP) verschiedener Proteine kann zwischen 11% (z. B. in Seidenfibroin) und 0% (z. B. in reiner Gelatine) betragen. Der Tyrosingehalt der Kern- und Cytoplasmaproteine schwankt im allgemeinen um 5%. Die Millonreaktion zeigt in Proteinen, je nach der angewendeten Variante, entweder die Anwesenheit von Tyrosin allein oder das Vorkommen von Tyrosin und Tryptophan. Sie wurde 1849 von A. N. E. MILLON eingeführt und wird in vielen Modifikationen häufig auch histochemisch angewendet. Das Verfahren von SERA und QUEIROZ LOPES, 1945 stellt nach Annahme der Autoren ausschließlich Tyrosin histochemisch dar. Die Variante nach BENSLEY und GRESH (1933) hat den Vorteil, daß sie bei Zimmertemperatur durchgeführt werden kann; die Farbreaktion ist recht dauerhaft. LISON, 1953 findet die Reagenzien nach POLLISTER 1947, denen anderer Autoren überlegen. POLLISTER und Mitarbeiter werten die Reaktion immer histophotometrisch quantitativ aus, worüber später eingehend berichtet werden soll.

Prinzip: der Millon-Reaktion ist, daß bei simultaner oder sukzedaner Behandlung gewisser phenolverbindungen in stark saurer Lösung mit einem Quecksilbersalz und mit salpetriger Säure (HNO_2) gefärbte Quecksilberkomplexe mit dem Nitrosoderivat der Phenikverbindung entstehen (GIBBS, 1920). Tyrosin und Tryptophan werden durch orange bis rosarote Färbung angezeigt. Die Farbreaktion bleibt etwa 1 Jahr stabil.

Zur histochemischen Untersuchung von **Proteinen** im allgemeinen kann gesagt werden, daß es keine Reaktion gibt, die für sich allein den Nachweis von Proteinen gestattet. Biochemisch werden zum Nachweis und zur Analyse von Eiweißkörpern unter anderem Flockungs-, Fällungs- und Farbreaktionen benutzt, während in der Histochemie davon nur die Farbreaktionen anwendbar sind. Die histologische Fixierung stellt an sich eine Fällungsreaktion dar. Die Wirkung der Fixierungsmittel als koagulierende Reagenzien ist aber derzeit, von Einzelfällen abgesehen, noch zu wenig genau bekannt, um daraus eindeutige Schlüsse ziehen zu können.

1. Die Färbung mit gepufferten Farbstofflösungen.
2. Die Argininreaktion.
3. Die Millonreaktion nach POLLISTER und Mitarbeiter.

Zum Nachweis von **Glykogen** wurden eine Reihe von Methoden entwickelt, die im Rahmen dieser Arbeit nur gestreift werden sollen. Die Jodreaktion ist einfach durchzuführen und gelingt sicher. Ihre modernen Varianten zählen zu den sensibelsten histochemischen Glykogennachweisen (R. E. MANCINI, 1948). Die modernen Abwandlungen sind besonders gut bei gefrier- getrocknetem Material. Die Carminfärbung nach BEST ist keine histochemische Reaktion im eigentlichen Sinne, sie ist ein heute noch gerne benutztes histologisches Färbeverfahren und liefert schöne klare Bilder.

a) Oxydationsmethoden:

1.) Die Chromsäure-Oxydationstechnik (Bauer, 1933) stellt vornehmlich Glykogen, daneben aber auch noch einige andere Polysaccharide histochemisch dar.

Prinzip:

Behandlung mit Chromsäure bewirkt an gewissen Polysacchariden chemische Veränderungen, wobei reaktionsfähige Aldehydgruppen auftreten. Diese werden mit Schiff'schem Reagenz (Nuchinschwefeliger Säure, Leukofuchsin) durch Bildung des bekannten Farbstoffkomplexes nachgewiesen. Es ist prinzipiell gleich, ob Chromsäure schon im Fixierungsgemisch enthalten ist oder nachträglich auf fixierte Schnitte einwirkt.

2.) Die Perjodsäure-Oxydationstechnik MANUS, 1946, LILLIE, 1947,

und HOTCHKISS 1948, stellt Glykogen besonders vollständig und kräftig dar, daneben allerdings auch mehr Angehörige der Saccharidgruppe als die Chromsäuretechnik (BAUER). Außer den bei dieser Reaktion genannten Substanzen reagieren z. B. noch Glykoproteine der Bindegewebe-Grundsubstanz, Fibrin, Mucopolysaccharide, manche Lipoide usw. positiv. Der Glykogen-Nichtglykogen-Kontrast ist also geringer. Es empfiehlt sich, durch Glykogendarstellung celloidinisierte Paraffinschnitte der PJS-Reaktion nach HOTCHKISS zu unterziehen und zur Oxydation die PJS-Lösung A zu verwenden.

3.) Die Bleitetraacetat-Oxydationstechnik (BTS-Reaktion). Die Modifikation dieses Verfahrens nach SHIMIZU und KUMAMOTO stellt Glykogen noch deutlicher als die PJS-Reaktion dar. Sonst gilt das für die Perjodsäure-Oxydationstechnik Gesagte auch hier.

b) Silbermethoden:

Alle Silbermethoden zum Nachweis von Glykogen und verwandten Substanzen wenden zunächst ein Oxydationsmittel an, um in den Polysacchariden Aldehydgruppen freizusetzen und stellen diese anschließend mit alkalischen Silberlösungen histochemisch dar. Diese Verfahren bieten gegenüber den anderen Oxydationsmethoden kaum einen Vorteil. Im allgemeinen kann gesagt werden, daß die Wahl des geeignetsten Darstellungsverfahrens für Glykogen und Kohlehydrate jeweils vom Untersuchten Material und vom Untersuchungsziel abhängt. Für Routine-Untersuchungen ist die Chromsäure-Oxydationsmethode (BAUER) oder die Carminfärbung (BEST) zu empfehlen. Für ein genaues Studium der Glykogenverteilung sollten celloidinisierte Paraffinschnitte von gefroren-getrocknetem oder nach LISON (Gefrier-Substituierung) fixiertem Material der PJS- oder der BTS-Reaktion unterzogen werden. Keines der angegebenen Verfahren zur Darstellung von Glykogen ist spezifisch. Die Ergebnisse müssen daher im Zweifelsfalle durch Kontrollversuche gesichert werden.

Für die **Sulfohydrylgruppen**, die schon vielfach Gegenstand histochemischer Untersuchungen waren, veröffentlichten verschiedene Autoren eine große Anzahl von Varianten der histochemischen Nitroprossid-Reaktion.

1. Verfahren nach MATTEI und DULZETTO (1928). Diese Methode wurde ursprünglich zum Nachweis für Gluthathion publiziert, gibt aber auch mit anderen SH-haltigen Substanzen positive Resultate.

2. Bei dem von Joyet-LAVERGNE (1928) angegebenen Verfahren führten drei Methoden zur Bestimmung von SH-haltigen Substanzen:

A) direkte Methode für frisches Gewebe (Nachweis freier SH-Gruppen).

B) indirekte Methode für frisches Gewebe (Nachweis aller SH-Gruppen). (freier und markierter) und

C) Methode für fixierte Gewebe (Nachweis proteingebundener AH-Gruppen).

Strukturen, die SH-Gruppen enthalten, sind rotviolett gefärbt; die Farbreaktion ist nicht beständig. Die Diffusibilität der in Variante B gebildeten oder in Variante C freigesetzten Sulfohydrylverbindungen dürfte zu Verschleppungen führen und macht ihren ortsrichtigen histotopochemischen Nachweis sehr unwahrscheinlich GLICK (1949).

3. Weitere Varianten sind die Methoden von GIROUD und BULLIARD 1933, BOURNE, 1935, HAMMETT und CHOPMAN 1939.

4. Aus allem ergibt sich, daß die Ergebnisse von Mitropositreaktionen sehr vorsichtig zu beurteilen sind und quantitativ mit einiger Sicherheit nicht ausgewertet werden können (HAMMETT und CHOPMAN).

5. Ein weiterer Nachweis für die SH-Gruppen ist der von CHEVREMONT und FREDERICK 1943. Das Verfahren ist eine histochemische Anwendung der Methode zur Bestimmung von reduziertem Glutathion in Gewebsextrakten (MASON, 1930) und beruht auf der Reduktion von farblosem Ferriferrocyanid zu Berliner Blau durch Sulfohydrylgruppen. Es kann natives und fixiertes Material in Form von Ausstrichen, Gefrier- und Paraffinschnitten bearbeitet werden. Da das Ferriferrocyanid-Reagenz nicht allein von SH-Gruppen, sondern auch von anderen reduzierenden Substanzen zu Berliner Blau reduziert wird, gewinnt der Hauptversuch erst dann Gültigkeit, wenn gleichzeitig ein Kontrollversuch angestellt wird.

Zum Nachweis der **Merkaptane und Thioketone** stehen bis in die jüngste Zeit drei Methoden zur histochemischen Untersuchung zur Verfügung (RATZENHOFER, 1952, BENNETT, 1951, BARNETT und SELIGMAN, 1952).

Die RATZENHOFER'sche Methode gestattet einen raschen Überblick über das Vorkommen von Thiol- und Thioketogruppen und ist eine sehr empfindliche qualitative histochemische Methode. Sie ist jedoch nicht sehr geeignet zur genauen Lokalisierung positiv reagierender Punkte (etwa in einzelnen Zellen und Zellenbestandteilen). Im Prinzip handelt es sich um eine histochemische Anwendung der Jodocid-Tüpfelreaktion (FEIGEL, 1934).

BENNETT's Verfahren ist eine histochemische Anwendung der von HELLERMANN und Mitarbeiter (1933) angegebenen Sulfohydrylreaktion. Dieses „rote Sulfohydrylreagenz“ (RSR) ist für Merkapthane ebenso spezifisch wie Phenylmercurichlorid. Mit Hilfe der RSR-Reaktion gelang es BENNETT Sulfohydrylgruppen in Gewebsstrukturen nachzuweisen, in denen sie bisher histochemisch noch nicht aufgefunden wurden.

Der Nachweis von R. J. BARNETT und A. N. Seligman wird hauptsächlich zur Feststellung proteingebundener Sulfohydrylgruppen verwendet. Im ganzen gesehen scheint das Reaktionsprinzip ziemlich kompliziert zu sein. Bevor die Färbemethoden, die zur quantitativen Bestimmung in der Histochemie verwendet werden, einer kritischen Betrachtung unterzogen werden, soll zunächst die enzymatische Histochemie noch kurz besprochen werden.

III. Enzymatische Histochemie

Nach DUSPIVA wird Enzymatische Histochemie heute methodisch nach zwei wesensverschiedenen Verfahren beschrieben.

1. Die ältere Methode geht von der histologischen Technik aus, verwendet aber an Stelle von Farbstoffen Substratlösungen.
2. Die andere in der Histochemie gebräuchliche Methode geht von vorneherein auf eine quantitative Erfassung der enzymatischen Aktivität von Gewebsstrukturen aus. Zu 1. Als Substrat eignen sich Stoffe, die in spezifischer Weise von einem Enzym gespalten werden, wobei aber die Bedingung erfüllt sein muß, daß die entstehenden Spaltprodukte entweder direkt mikroskopisch sichtbar sind oder leicht in optisch nachweisbare Produkte übergehen können. Das entstandene Reaktionsprodukt muß vollständig unlöslich sein und in der Zelle am Orte der enzymatischen Aktivität liegen bleiben. Leider sind bis heute noch keine idealen Substrate bekannt. Eine intakte Zell- und Gewebsstruktur ist nur bei lebenden Objekten garantiert, wobei jedoch die Verwendung lebender Gewebe zu Schwierigkeiten hinsichtlich eines ungestörten Kontaktes zwischen Enzym und Substrat führt. Infolgedessen muß das Gewebe vor dem Test abgetötet werden, ein Eingriff, der einen Aktivitätsverlust bedeuten und zu schwer kontrollierbaren Verlagerungen und Adsorptionen der Enzyme an andere Zellstrukturen führen kann. Es liegt in der Wesensart dieser mikroskopischen Technik, daß die Resultate zumeist einen qualitativen Charakter tragen. In ihrer heutigen Form gibt diese Technik in den „Dimensionen“ der Gewebshistochemie oft gute Ergebnisse. In der Cytochemie werden die Färbemethoden zur Zeit noch erheblich, grundsätzlich kritisiert, insbesondere hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für das Studium der interzellulären Enzymverteilung.

Zu 2. Hier beginnt die Analyse mit einer Homogenisierung der Probe, um die wichtigste Voraussetzung für einen definierten Spaltungsverlauf, einen guten Kontakt von Enzym und Substrat zu gewährleisten. Die Spaltprodukte werden auf chemisch-analytischem Wege erfaßt. Ein wesentlicher aber sehr schwieriger Teil der Analyse besteht darin, die in komplexer Weise ineinander greifenden Strukturelemente der Organismen zu ordnen, zu isolieren und ihrer Menge nach zu erfassen, um eine Bezugsgröße zu schaffen, auf welche die gemessene Enzymaktivität bezogen werden kann. Aus der histologischen Strukturanalyse und der Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Schnitte sind Rückschlüsse auf die Verteilung der Enzyme möglich.

IV. Quantitative Färbemethoden

Die von FEULGEN und ROSSENBECK (1924) angegebene Reaktion (Nuclearreaktion) ist das älteste histochemische Verfahren zum spezifischen Nachweis der Desoxyribonucleinsäure (DNS). Obwohl das Verfahren vielfach und mit Erfolg angewendet wird, ist sein qualitativer **und** quantitativer Wert nicht unbestritten geblieben. Nach dem heutigen Stande unseres Wissens ist es aber so gut wie sicher, daß die korrekt ausgeführte FEULGEN-Reaktion (FR) DNS spezifisch nachweist und auch richtig lokalisiert. Die von FEULGEN und ROSSENBECK entdeckte Reaktion beruht auf dem histochemischen Nachweis potentieller Aldehydgruppen, die durch milde saure Hydrolyse (mitn HCl bei 60° C) aus dem Zuckeranteil der DNS freigesetzt werden können. Schon FEULGEN und ROSSENBECK erkannten, daß durch Saureinwirkung aus dem Verband der DNS die Purinkörper Guanin und Adenin abgespalten werden, wobei der verbleibende Rest (Thyminsäure) an Protein gebunden am Ort erhalten bleibt und reaktionsfähige Aldehydgruppen bekommt. Letztere werden dann mit SCHIFF'schem Reagenz histochemisch nachgewiesen. Die FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion kann an Ausstrichen, Gefrier- und Paraffinschnitten sowie im Block ausgeführt werden. (VOSS, 1926, LHOTKA und DAVENPORT, 1947/49). Für histochemische Zwecke ist jedoch die Schnitttechnik dem Blockverfahren vorzuziehen (BOVAN, 1955). Ferner ist die Verarbeitung von Zellsuspensionen möglich. Die Nuclealfärbung von FEULGEN und ROSSENBECK kann mittels histophotometrischer Messung der Reaktionsintensität auch zur quantitativen Bestimmung der DNS in den Zellkernen dienen. Hierbei sind verschiedene Faktoren bei der FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion zu beachten, die konstant gehalten werden müssen, um genaue Werte zu bekommen. Die wesentlichste Rolle spielen: Art der Fixierung, pH, Dauer und Temperatur der Hydrolyse, Qualität des Schiff'schen Reagenz und auch die Zusammensetzung des SO₂-Wassers (SHIBATANE, 1952). Die erzielten Resultate sind nur dann miteinander vergleichbar, wenn die genannten Faktoren konstant gehalten werden. Es empfiehlt sich daher die Schnitte der verschiedenen Gewebe, die miteinander verglichen werden sollen, möglichst auf einen Objektträger zu befestigen und alle Präparate gleichzeitig der FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion zu unterziehen. Schließlich darf noch der Penetrationseffekt der chemischen Substanzen nicht übersehen werden, der bei der Auswertung unbedingt zu berücksichtigen ist. In der Peripherie des Blockes ergeben die Kerne in einer 50–100 μ breiten Zone regelmäßig höhere Werte als im Zentrum. Bei der Verwendung nativer Gefrierschnitte, gefroren-getrocknetem Material oder von Gewebshomogenaten tritt dieser Penetrationseffekt nicht auf. Für die Gültigkeit histophotometrischer Messungen ist es wesentlich, daß zwischen DNS-Menge und Intensität der FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion eine lineare Beziehung besteht. (RIS und MIRSKY, 1949, LEUCHTENBERGER, VENDRELY und VENDRELY, 1951, WALKER und GATES, 1952, LEUCHTENBERGER 1954 fanden eine gute Übereinstimmung der Meßergebnisse der FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion mit den

Resultaten der biochemischen Bestimmungen bzw. U. V.-Absorptionsmessungen. LEUCHTENBERGER beweist in ihrer Arbeit die Genauigkeit der FEULGEN und ROSSENBECK-Reaktion, Mikrospektrophotometrie, an Hand der DNS-Daten von 15000 Kernen verschiedener Gewebe. Es wurden gleichzeitig an demselben Material die UV Mikrospektrophotometrie, chromosomale Studien und DNS-Bestimmungen mit biochemischen Analysen ausgeführt. Zusammenfassend äußert LEUCHTENBERGER: „Auf Grund der in der Tabelle aufgezählten Daten darf man wohl mit Recht sagen, daß die Mikrospektrophotometrie der FEULGEN-Färbung als ein verlässliches Werkzeug zum Vergleich relativer DNS-Mengen in Kernen verschiedener Zellen benützt werden kann, vorausgesetzt daß die zu findenden Unterschiede genügend groß sind“. Außerdem waren die Ergebnisse anderer Autoren im wesentlichen in Übereinstimmung mit den in der Tabelle gebrachten Daten.

Die MILLON-Reaktion (POLLISTER und RIS, 1947) wird als weitere Färbemethode zur quantitativen Auswertung beschrieben. Der bei der MILLON-Reaktion entstehende Komplex aus Quecksilber und dem Mitrosoderivat des Tyrosin im Adsorptionsspektrum zwei Extinctionsmaxima: Eins im UV Bereich (3550 Å), ein zweites im Bereich des sichtbaren Lichtes (4800 Å). Allerdings darf von vornherein gesagt werden, daß die Spezifität der MILLON-Reaktion zu wünschen übrig läßt. Das MILLON-Reagenz gibt nämlich nicht nur mit Tyrosin, sondern auch mit Tryptophan (LEUCHTENBERGER, 1950, LYSON, 1953) eine positive Farbreaktion. Außerdem ist die Empfindlichkeit der MILLON-Reaktion verhältnismäßig gering. Wenn geringe Tyrosinmengen in kleinen Gewebsstrukturen erfaßt werden sollen, läßt die Stärke der Farbreaktion manchmal zu wünschen übrig. Einigermmaßen sichere Ergebnisse sind in solchen Fällen nur mit der histophotometrischen Methode zu erzielen. RASCH und SWIFT (1953) fanden jedoch bei ihren Studien, daß die histophotometrische Methode der MILLON-Reaktion nur unter gewissen Bedingungen einwandfrei ausgewertet werden kann. Da die Lage und Höhe der Absorptionsmaxima von Temperatur, pH und Einwirkungsdauer der gewünschten Reagenzien abhängig sind, muß für jede untersuchte Struktur eine ganze Absorptionskurve hergestellt werden, um Verschiebungen der Maxima feststellen zu können. Es muß sowohl das Ausmaß der als Nebenreaktion ablaufenden Diazoreaktion, die HNO_2 des MILLON-Reagenz kann nämlich mit Gewebskomponenten AZO-Verbindungen (stärkste Absorption zwischen 3000 Å und 4000 Å) bilden als auch die Größe der Lichtstreuung festgestellt und korrigiert werden. Es dürfen schließlich nur Proteine miteinander verglichen werden, die in ihren wesentlichen Eigenschaften einander ähnlich sind. Bei quantitativer Auswertung der MILLON-Reaktion ist vor allem noch zu bedenken, daß die Reaktionsstärke einer gegebenen Struktur von

- a) der Proteinkonzentration (der Dichte) dieser Struktur
 - b) dem relativen Gehalt des Proteins an Tyrosin (und Tryptophan)
- abhängt.

Abschließend kann zur quantitativen Hystochemie gesagt werden, daß eine große Zahl von Faktoren bei der Herstellung und Auswertung histochemischer Präparate zu berücksichtigen ist. Es ist im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, alle histochemischen Färbemethoden, die sowohl für qualitative wie quantitative Bestimmungen geeignet sind, aufzuführen. Im Hinblick auf die quantitativen Bestimmungsmethoden ist noch eine gewisse Skepsis und Zurückhaltung angebracht, denn wie GOMORI sagt, ist „eine quantitative Auswertung histochemischer Präparate“ zwar schon oft versucht worden, stößt aber heute noch auf große Schwierigkeiten. Eine kritische Diskussion dieser Probleme gaben GLICK, ENGSTROEM und MALMSTROEM. Auf cytochemischem Gebiet unterliegen die Färbemethoden zur Zeit noch schwerer Kritik, besonders hinsichtlich ihrer Brauchbarkeit für das Studium der intracellulären Enzymverteilung. (Autoren von Seite 16-30 zit. n. W. Lipp, Histochem. Methoden, R. Oldenburg, München)

V. Strahlenwirkung auf biologische Systeme

Nach Darstellung der elementaren Grundlagen der Histochemie (Fixierung, Färbung und quantitative Bestimmungsmethoden) sollen die Ergebnisse histochemischer Untersuchungen der Strahlenwirkung auf biologische Systeme übersichtsweise angeführt werden.

SPEAR (169) konnte bei Bestrahlungen von Hühnerfibroblasten-Kulturen mit γ -Strahlen zeigen, daß schon kleinere Dosen (33r) eine Verminderung der Mitoseerscheinungen bewirken. Nach einer gewissen Zeit ist die Wiederherstellung vollkommen, die Kulturen entwickeln sich normal. 18000r bewirken den Tod einer gewissen Anzahl von Zellen, allerdings erst nach einigen Tagen. Die Basis zur endgültigen Blockierung der Mitosen ist also unterschiedlich. Zur Tötung aller Zellen bedarf es 117000r; in diesem Falle geht wahrscheinlich eine massive Zerstörung der Zellproteine vor sich. Zunächst ist die Strahlenempfindlichkeit unter Berücksichtigung des Absterbens vom Entwicklungsstadium des Objekts abhängig. Die Einzelzelle ist in der Mitose selbst am empfindlichsten, im Ruhezustand ist die Strahlenempfindlichkeit meist wesentlich geringer als in den verschiedenen Stadien der Mitose: die Sensibilität ist am Ende der Prophase am größten. Zellen, die in Teilung begriffen sind, beenden dagegen während der Bestrahlung ihre begonnene Mitose im normalen Rhythmus. Wird die Intensität der Bestrahlung ständig erhöht, verlängert sich die für den Eintritt der Mitose erforderliche Zeit und es tritt ein „letal Effekt“ auf (ERERRA). Die Zellmultiplikation bleibt nach 2 oder 3 methodischen Zyklen stehen und die Zellen gehen schließlich zu Grunde (Retinazellen, γ -Strahlen); Parametrium, Hefe (U. V.) Pollenkörner und Tradescantia (Rö.). Wie die grundlegenden Arbeiten von O. HERTWIG (70) und anderen Autoren zeigen, verhalten sich die Embryonalzellen ähnlich. Mäßige Rö = oder U. V.-Dosen verursachen eine Verzögerung in der Bildung der ersten Segmentfurche (s. a. DALCY (33) 1931). Bei Anwendung noch größerer Intensitäten wird das Auftreten der ersten Segmentfurche proportional zur U. V.-Dosis verzögert. Andere Gruppen von Organismen (Bakterien, Schimmelpilze) weisen die gleichen radiobiologischen Verände-

rungen wie die komplizierteren Organismen auf. GATES (55) konnte bei U.V.-Bestrahlungen von *E. Coli communis* feststellen, daß einige Zellen sofort getötet werden, anderen ihre normale Form beibehalten, wieder andere sich nur mehr zwei- oder dreimal teilen können und danach degenerieren. Eine andere Gruppe behält ihre Beweglichkeit bei, wird aber merklich länger; diese fadenförmigen Gebilde können degenerieren und oft zu Zellen zerbrechen, die ihrerseits wieder Kolonien ins Leben rufen können. Dieses Zellbild wurde von vielen Autoren gesehen, vornehmlich bei Röntgen- oder U.V.-Bestrahlung. LEA berichtet über ähnliche Fälle bei Algen, Protozoen und Tumoren von Säugetieren. Es würde den Rahmen dieser Arbeit überschreiten, alle zur Frage des letalen Effektes von Bestrahlungen an Mikroorganismen vorliegenden Arbeiten anzuführen. Erstaunlich ist jedoch die große Differenz in der Radiosensibilität der verschiedenen Arten.

Wir sehen also für sehr verschiedene Organismen immer wieder außer einem durch beträchtliche Intensitäten hervorgerufenen sofortigen Tod einen allgemeinen mitotischen „Rhythmusverlangsamungseffekt“ (ERERRA). Verlangsamung der Prophase im Falle von metazoären Zellen oder von Embryonen, Vermehrung der Latenzphase der Bakterien. Ein anderes, einer großen Serie von Systemen gemeinsames Phänomen ist die deutlich erhöhte Sensibilität der Zellen, sobald die Bestrahlung im Verlaufe der Zellteilung erfolgt. Seit BERGONIE (16) und TRIBONDEAU haben sich die Beispiele von der Erhöhung der Radiosensibilität während der Zellteilung vervielfacht, wobei, wohl verstanden, nur Zellen der gleichen Art verglichen werden dürfen. FISHER (51) und COX (28) konnten dies beim Wachstum der Kulturen von metazoären Zellen nachweisen. Das gleiche gilt für die Zellen der im Wachstum begriffenen Mikroorganismen. Bei den Segmentation begriffenen Eiern ist allerdings die Rolle der Mitose bisher nur schwer zu erklären.

Schon zu Anfang der strahlenbiologischen Forschung wurde eine Vielzahl von sehr unterschiedlichen Schädigungen der Zellkerne festgestellt: Verklebungen der Chromosomen, Pyknose des Kerns, abnormale Abteilung des Chromatins bei der Tochterzelle, Chromosomenrupturen, Verschiebungen usw. Die letztgenannten Schädigungen konnten besonders deutlich an Organismen mit guten chromosomalen Bildern (Liliaceen, Askardien, Riesenchromosomen der *Drosophila*) gezeigt werden. Diffuse Kernschädigungen wurden bei jungen Embryonen sehr häufig beobachtet. Diese Kernschädigungen stehen in Übereinstimmung mit den cytoplasmatischen Schädigungen, auf welche SIMON (159) besonders hingewiesen hat; Zytoplasmaschäden sind meistens nicht so deutlich. SCHLEIP (163) konnte nach U.V.-Bestrahlung feststellen, daß zur üblichen Schädigung des ganzen Zytoplasmas viel größere Intensitäten angewendet werden müssen als beim Kern. Hier ist die alte Frage nach der direkten oder indirekten Strahlenwirkung auf den Zellkern bzw. Chromosomen akut, ohne daß sie jedoch bis heute befriedigend geklärt werden konnte. Die große Strahlen-

empfindlichkeit der Spermatozoide, die eigentlich kein Zytosplasma besitzen, scheint ebenfalls anzuzeigen, daß für die Erzeugung haploider Embryonen oder zur Verzögerung der Segmentation cytoplasmatische Schädigungen überflüssig sind. Die Arbeiten von WITHING (190) und d'ASTAUROV (3) sprechen für eine direkte Schädigung der Chromosomen zur Zeit des Auftretens der genetischen Läsionen. WITHING und d'ASTAUROV fanden, daß unversehrte Spermakerne sich normal im intensiv röntgenbestrahlten Cytoplasma von Eiern teilen und daß sie die Entwicklung „androgener Männchen“ bei der Wespe *HABROBARCON* und besonders beim Seidenwurm veranlassen. Demgegenüber stehen die eigenartigen Beobachtungen von DURYEE (40, 41) nach denen Kernschädigungen wie Pyknosen, Vakuolenbildung, Änderung der Nucleolen möglich sind, wenn in einen frischen Frosch-Oocyten Cytoplasma von einem röntgenbestrahlten Oozyten injiziert wird. Nucleare Schädigungen nach Bestrahlung isolierter Kerne treten erst nach Anwendung bedeutender Intensitäten auf. Zweifellos gibt es cytoplasmische Schädigungen, die sich auf den Kern bzw. die Chromosomen fortleiten. MAZIA (120) HIRSHFIELD haben deren Beziehungen zu den Kernschädigungen studiert, indem sie Amobenfragmente mit und ohne Kern U. V. bestrahlt haben. Es zeigte sich, daß jedes einzelne Fragment sensibler ist als die ganze Amöbe; dies scheint eine Schutzwirkung des Cytoplasmas für den Kern und umgekehrt zu beweisen. Heute steht jedoch sicher fest daß die Einwirkung energiereicher Strahlen auf mitotische Zellen die indirekte Strahlenwirkung keineswegs ausschließt. Nach HEVESY beruht die reversible Mitosehemmung sogar nur auf indirekter Strahlenwirkung: Im Plasma wird Ribonucleinsäure aufgebaut. Während der Mitose wird die Nucleinsäure für den Chromosomenaufbau benutzt (Ribonucleinsäure wird in Thymonucleinsäure umgewandelt). Dieser Vorgang läßt sich mit radioaktiven Indikatoren verfolgen, welche in Form anorganischer Salze dem Plasma beigegeben werden, zuerst in der Ribonucleinsäure und schließlich in der Thymonucleinsäure erscheinen. Man kann nun feststellen, daß bereits durch kleine Dosen dieser Umbau der Ribonucleinsäure in Thymonucleinsäure verzögert und die Mitosehemmung parallel der Hemmung dieses Umbaues verläuft. Da es sich also um eine Oberflächenreaktion handeln muß und insbesondere die hierfür notwendigen Dosen außerordentlich klein sind, schließt HEVESY, daß die Strahlenwirkung indirekt erfolgt, indem im umgebenden Plasma aktivierte Moleküle zur Chromosomenoberfläche hindiffundieren und die dort stattfindenden Oberflächenreaktionen hemmen. HEVESY (65) denkt dabei vorwiegend an aktivierte Wassermoleküle. Es ist aber nach HEVESY auch durchaus möglich, daß es sich um eine mehrfach indirekte Strahlenwirkung handelt, wobei zunächst durch die aktiven Wassermoleküle irgendwelche organischen Moleküle aktiviert werden, welche dann die Nucleinsäure hemmen. Der Beweis, daß es sich bei dem gesamten Vorgang um indirekte Strahlenwirkung handelt, kann nach HEVESY auch unmittelbar geführt werden. Deckt man einen kleinen Bezirk eines Sarkoms mit Blei ab, so ist nach Röntgenbestrahlung auch unter dem Bleistück der Nucleinsäureumbau gehemmt. DARLINGTON (36) vermutet, daß infolge Nucleinsäureverarmung auch eine erhöhte

Wahrscheinlichkeit für die spontane Entstehung von Kernschäden (Chromosomenbrüchen) besteht. Damit würde dann auch eine irreversible Schädigung von mitotischen Fällen durch die indirekte Strahlenwirkung energiereicher Strahlen bewirkt.

Bei Betrachtung radiogenetischer Effekte sind zwei Haupttypen abgrenzbar: 1. Die Einwirkung der Strahlen auf die Struktur der Chromosome. 2. Die Mutationen. Die Morphologie der beobachteten Rupturen und Verschiebungen hängt wesentlich von der Disposition der Chromosomen im Augenblick der Bestrahlung ab. Diese Gegebenheit spricht für einen direkten Reaktionsmechanismus (z. B. LEA). Ein weiteres Argument, welches für diese Hypothese spricht, kann in einer Beobachtung von BISHOP (19) gesehen werden: Rupturen von Chromosomen werden schon 3 Minuten nach der Bestrahlung mit 450 r von *Spermatozyten* I. Ordnung von *Chorthophaga viridifasciata* sichtbar. Nach einer längeren Latenzzeit fügen sich zahlreiche freie Fragmente wieder zu neuen Anordnungen zusammen und es kommt schließlich auch noch zu Restaurierungen. Diese neuen Anordnungen können Anomalien in der Teilung der Chromosome nach sich ziehen, ja es können sogar die Mitosen gehemmt werden. Nach „Wiederverbindung“ ist ein Teil der Schädigungen der Chromosomen praktisch manifest und kann mehrere Zellgenerationen nach der Bestrahlung nachgewiesen werden. Was die Strahlenart in Bezug auf Chromosomenschädigung betrifft, kann gesagt werden, daß mit U. V. Licht schwer Strukturanomalien zu setzen sind. Für die Röntgenstrahlen hat sich ergeben, daß bei Dosen bis zu einigen 100 r die Zahl der Einfachbrüche und die der Doppelbrüche proportional der Dosis und unabhängig von der Dauer der Bestrahlung ist. Die Dosisproportionalität und Unabhängigkeit von der Bestrahlungsdauer findet sich auch bei allen anderen energiereichen Strahlungen. Beim Chromatid austausch gilt jedoch für Röntgenstrahlen eine Besonderheit. Zu konstanter Bestrahlungsdauer und Steigerung der Dosis ergibt sich ein wichtiger Unterschied zu den Befunden bei den Brüchen nach U. V. Die Ausbeute nimmt proportional mit dem Quadrat der Dosis zu, und es tritt ein Zeitfaktor auf: die Ausbeute nimmt ab, wenn die Bestrahlung über längere Zeit (< 1 Min.) ausgedehnt wird. Es ergibt sich ferner für die absolute Ausbeute an Brüchen und an Chromatid austausch eine charakteristische Abhängigkeit von der Strahlenart bzw. von der Wellenlänge der benutzten Röntgenstrahlenart.

Reich ist die Literatur, die nach der Entdeckung von MÜLLER (126), die Möglichkeit von Mutationen als Bestrahlungsfolge bei den verschiedensten Organismen bestätigt. Wenn man die Wahrscheinlichkeit vergleicht, mit der ein GEN unter dem Einfluß einer bestimmten Strahlenintensität verändert wird, (Mutationskonstante), so findet man, daß die Größenordnung dieser Konstante für die verschiedensten Organismen ziemlich nahe beieinander liegt. Dies weist auf eine Ähnlichkeit der lädierten Struktur hin. Die innere Natur dieser Mutationen bleibt uns freilich noch unbekannt, doch stellen die Arbeiten von BEADLE (11) und TATUM (die Entdeckung der biochemischen Mutanten bei den Mikroorganismen) einen großen Fortschritt dar. Durch sie ist die Möglichkeit gegeben, den Mechanismus der Mutationen zu studieren. Die Existenz eines

Enzyms wäre von der Integrität eines oder mehrerer GENE abhängig. Alle Zelltätigkeiten, die von der Gegenwart des Metapolyten, dessen Synthese unterbrochen wird, abhängen, hören auf. Solche Typen von Mutationen wurden hauptsächlich bei Mikroorganismen beschrieben (*Neurospora*, *Penicillium* und *Aspergillus*). Man kann z. B. mit U.V.-Strahlen Mutationen des Bakteriophagen T₂ anregen, aber nur unter der Bedingung, daß er sich als Parasit in E-Coli befindet. Ebenfalls werden Mutationen durch Röntgenstrahlen beim Tabakmosaikvirus erst ausgelöst, wenn er sich im Wirt befindet. Es müssen gewisse sekundäre Faktoren miteinbezogen werden, um bei diesen Organismen Mutationen erfüllen zu können. Andere Eigenschaften der Mutationen machen ihr Zustandekommen verständlicher, nämlich die Latenz bei ihrem Auftreten und die Reversibilität. DEMEREC (37) und LATARYET studierten die Verzögerung der Mutationen am Bakterium Coli. Sie fanden, daß nach Bestrahlung dieses Organismus eine gewisse Zahl von Überlebenden gegenüber dem Bakteriophagen T resistent geworden ist. Außerdem wurde gefunden, daß bei relativ mäßigen Dosen (800 erg/mm²) die Zahl der gleich nach der Bestrahlung beobachteten Mutanten etwa 100 mal kleiner ist als nach etwa 13 Teilungen. Nach 13 Generationen treten keine weiteren Mutationen mehr auf. Es ist ein von der Wartezeit unabhängiger Endwert der Mutationsrate erreicht.

In einer Tabelle von DEMEREC und LATARYET werden die Versuchsergebnisse wiedergegeben, wobei „O-Punktmutation“ sich auf die Werte gleich nach der Bestrahlung bezieht und „Endpunktmutation“ auf die Wartezeit entsprechend 13 Teilungen. Eine vergleichbare Wirkung von Zellteilungen hat man bei verschiedenen Zellen, die bei Mutationen entstanden sind, gefunden, und zwar bei Spontanmutationen, bei durch Bestrahlung ausgelösten und bei durch chemische Substanzen hervorgerufenen. Der Latenzeffekt ist bis jetzt nur unvollkommen erklärt. TIMOFFEEFF RESSOVSKY (176) hat schon vor 15 Jahren bekannt gegeben, daß gewisse spontane Mutationen der *Drosophila* sich mit ebenso großer Wahrscheinlichkeit in beiden Richtungen abspielen. RYAN (156) und LEDERBERG konnten beobachten, daß ein Stamm von *Neurospora* dessen Wachstum von einer Aminosäure abhängt, nämlich dem Leucin, eine Rückmutation erleiden kann, welche den Organismus von dieser Aminosäure unabhängig macht. Ähnliches Verhalten konnte LIEB (110) beim Studium eines Stammes von E-Coli feststellen, der von der Anwesenheit von Histidin in der Kultur abhängig gemacht wurde. Ähnliche Fälle gibt es in der Literatur bei DAVIS (35) und KAPLAN (81). GILES (58) und LEDERBERG konnten ebenfalls sehen, daß es möglich ist, Rückmutationen zu erzielen, nicht nur mit Röntgen- und U.V.-Strahlen, sondern auch mit dem Sdotop P³² und sogar mit Iost. Wenn wir uns mit der Wirkung der Strahlen auf die lebende Zelle auseinandersetzen, so können wir feststellen, daß viele Disziplinen wie: Physik, Physiko-Chemie, Biologie, Biochemie und Histochemie alles einsetzen mußten, um nur ein bißchen Licht in dies dunkle unerforschte Gebiet hineinzutragen. Es sind unübersehbare Reaktionen, die ablaufen von dem Moment an, wo die Strahlen auf

sie einwirken, bis zu dem Zeitpunkt, wo die Schädigung sichtbar wird. Einen großen Teil der heutigen Kenntnisse haben wir der Physik zu verdanken, sie ist es, welche die qualitativen und quantitativen Gesetze des Wirkungsmodus der Bestrahlung auf die Materie im allgemeinen aufgestellt hat. Sie ist es ferner, welche uns eine immer breiter werdende Skala bei den Bestrahlungsenergien zur Verfügung gestellt hat, ob es sich nun um elektromagnetische oder corpuskulare Strahlungen handelt. Aus den zahlreichen theoretischen und technischen Gegebenheiten, welche uns die Physik liefert, sind die Absorptionerscheinungen der Strahlung in der Materie von größter Wichtigkeit für die Radiobiologie. Die Tatsache der diskontinuierlichen Absorption der Strahlenmenge in der Materie durch elementare Quanten- oder Energiemengen war vor 30 Jahren noch sehr revolutionär. Heute erscheint es nicht mehr außergewöhnlich, seitdem wir von der Materialisation der Energie und umgekehrt von der Aussendung elektromagnetischer Strahlungen durch Vernichtung eines Elektrons oder eines Positrons wissen. Es ist uns bekannt, daß die Absorption der Energie einer Strahlung eine Reihe von Exzitationen und Ionisationen der Atome auslöst. Wir wissen heute, daß die Ionisation eine außerordentliche Rolle spielt und daß sie sich verschieden offenbart, je nach der Einfallenden Energie und der Natur des absorbierenden Milieus. Für die Strahlenbiologie scheint die Streuabsorption nach COMPTON die größte Rolle zu spielen. Außer dem COMPTON-Effekt kennen wir den photoelektrischen Effekt, und als dritten Prozeß ist heute die Paar- oder Zwillingsbildung bekannt, welche aber erst eintritt, wenn die Photonenenergie einige Millionen Voltelektronen überschreitet. Weil die Ionisation als so wichtige Erscheinung erkannt wurde, war es von Bedeutung, ihr Verhalten in der Materie zu kennen. Man mißt die Zahl von hervorgerufenen Ionisationen mittels der Volumeneinheit der Materie; die Messungen finden in einer Ionisationskammer statt; um ein gemeinsames Maß zu haben für den Vergleich des Wirkungsunterschiedes einer α -, β - oder μ -Strahlung führte man den Begriff der Ionendichte ein. Er gibt die Anzahl der Ionenpaare an, welche auf dem Weg einer getrennt vorgenommenen Bestrahlung erzeugt werden. Nachfolgendes Schema aus einer Arbeit von GRAY zeigt eine Verteilung der Ionengruppen, welche durch verschiedene Strahlungen im Vergleich zu den Dimensionen eines Virus von 27 m μ freigeworden sind. Dieses Schema kann nur theoretisch sein, denn wir wissen, daß der Durchgang einer Strahlung nicht immer gradlinig ist und wir wissen ferner sogar, daß er am Ende seines Verlaufes — im Augenblick wo er die größte Energie in einem kleinen Raum abgibt — unvorhergesehenen kinetischen Gesetzen unterworfen ist. Jedenfalls können wir sehen, daß die Strahlungen vor allem durch ihr Ionisationsvermögen wirken. Die unterschiedliche Wirkung hängt ab von der absorbierenden Menge, der Ionendichte und der Verteilung der Ionisation.

Sehen wir nun, was die Physiko-Chemie und Chemie dazu beitragen konnte, um das Problem der Wirkung der Strahlen auf die lebende Zelle voranzutreiben. DE PLAEN sagt sehr klar: „Das radiochemische Problem ist für die Biologen von einer

gewissen Wichtigkeit, weil die Zellen ein in ständiger Aktivität begriffenes Laboratorium ist und weil die Zellschädigung mit der Unordnung mit der Aktivität dieses Laboratoriums verknüpft ist." Wenn wir uns mit dem Problem der Radiochemie näher befassen, so müssen wir uns klar werden, daß ein Unterschied besteht zwischen einer chemischen Lösung und der lebenden Zelle. Die Zelle umfaßt eine komplexe kolloidale Struktur, bestehend aus dem Kern, dem Protoplasma und vielen anderen Einschlüssen. Wichtige Faktoren bei der Strahlenschädigung bilden die physiko-chemischen Phänomene wie: kolloidale Phänomene, Oberflächenphänomene. Lange schon bekannt sind die Viscositätsveränderungen bei röntgenbestrahlten Lösungen. Die wiederholte Bestrahlung löst eine Erhöhung der Viscosität aus, die zuerst noch reversibel bleibt, in der Folge aber irreversibel wird, wenn man die Bestrahlung wiederholt. Bei andern Experimenten hat man die Erscheinung einer Mikroflockenbildung, eines Absinkens des pH und der Oberflächenspannung gezeigt. REISS (COURS de Physique biologique) berichtet, daß es sich nicht um eine Neutralisation der positiven Aufladungen der Kolloide handelt, weil sie beiderseits des isoelektrischen Punktes an verschiedenen pH stattfinden. Seit 1928 (GUEBEN C. R. Ac. Sc) weiß man, daß die Variation der dielektrischen Konstante eines bestrahlten Solvens in elektrolytischen Milieus gleich 0 ist. Man bemerkt keine Veränderung der Leitfähigkeit elektrolytischer Lösungen, nimmt sie aber wahr in den reinen dielektrischen Lösungen, wo die durch die Röntgenstrahlen erzeugten Ionen die Leitfähigkeit quantitativ auf die elektrolytischen Ionen übertragen. Diese Gegebenheiten, wie sie die physiko-chemischen Eigentümlichkeiten nach Bestrahlung zeigen, sind bei der Auslegung der radiozellulären Spätreaktion und derjenigen Reaktionen, die auf wiederholte Bestrahlung folgen, von größtem Interesse. Vielleicht, so folgert PLAEN, könnten diese Gegebenheiten neue Elemente liefern zum Verständnis der Stabilität der im Ruhezustand bestrahlten Zelle, verglichen mit der in Teilung begriffenen.

Einen nicht unwesentlichen Anteil zum besseren Verstehen der Wirkung der Strahlen auf biologische Systeme hat die Chemie beigetragen. Nach den Arbeiten von WEISS und LEA wurde bekannt, daß das H_2O_2 kein wichtiges Aktivierungselement ist, sondern daß sich freie Radikale bilden, unter welchen das aktivierte OH das wichtigste ist. FRICKE (53) konnte bei verdünnten Lösungen zeigen, daß die Strahlenwirkung unabhängig ist von der Konzentration derselben, was DALE (32) für die enzymatischen Lösungen bestätigen konnte. Dieses Phänomen ist bekannt unter dem Namen Dilutionseffekt. Auf Grund dieser Experimente muß man zugeben, daß in verdünnten Lösungen die Strahlenwirkung durch das Dazwischentreten der Aktivierungsprodukte des Wassers stattfindet. Diese radiochemischen Untersuchungen sind von größter Wichtigkeit zum besseren Verständnis bei der biologischen Strahlenwirkung. Eingehende Literaturnachweise auf diesem Gebiet finden wir bei GEHRIG (209). Diss. 1955. Außerdem ginge aus diesen Gegebenheiten hervor, daß die Strahlenwirkung wenigstens teilweise eine indirekte ist. Aus diesen Darlegungen könnte man noch die Erklärung

ableiten, die schon früher andeutete, warum die in Mitose befindliche Zelle empfindlicher als die ruhende ist. Die Abgrenzung der letzteren müßte die aktivierten Substanzen des Wassers daran hindern, zu diffundieren und die oxydierbaren Bestandteile der Zelle zu erreichen. Die Wirkung der Strahlen auf chemische Substanzen konnte auch an den Enzymen gezeigt werden. Nach den mitgeteilten Tatsachen scheint die Wirkung bei den üblichen Bestrahlungsdosen eine indirekte zu sein. DALE hat beobachtet, daß die verdünnte Carboypeptidase bei einer Bestrahlung von 50 r auf 30% inaktiviert wird, während man bei einer Lösung die 345 x konzentrierter ist, 100000 r benötigt, um den gleichen Effekt zu erzielen. Zum Schluß wollen wir noch auf die depolymerisierende Wirkung der Strahlen bei komplexen Substanzen, wie den Nucleinsäuren hinweisen. Die von LIMPEROS und MOSHER (Am. J. Roentgenol. 1950) studierte DNS hat ein spezielles Interesse hervorgerufen, weil sie einen der wichtigsten Bestandteile des Chromatins darstellt. PLAEN sagt: „Im ganzen gesehen erscheint eine gewisse Anzahl von Strahlenwirkungen auf die isolierten Zellsubstanzen festgestellt: ob man eine indirekte Wirkung durch das Dazwischentreten der Aktivierungsprodukte des Wassers bei biologischen Dosen annimmt, oder ob man annimmt, daß es sich um eine direkte Wirkung auf die Molekularstrukturen bei größeren Dosen handelt, immer erscheint es sicher, daß die Strahlungen auf die stark oxydablen Funktionen und auf die wenig cohäsiven Verbindungen, wie sie gewisse Polymeren darstellen, einwirken“. Beim Wirkungsmodus der Strahlen gelten heute noch wie vor vielen Jahren folgende Punkte:

1. Es vergeht eine mehr oder weniger lange Latenzzeit zwischen dem Augenblick der Bestrahlung und der Erscheinung der Zellläsion.
2. In der Teilung befindliche Zellen sind empfindlicher als ruhende. Die Sensibilität ist am größten am Ende der Prophase.
3. Die indifferenzierten jungen Zellen sind empfindlicher als die differenzierten und ausgereiften.
4. Der empfindlichste Teil der Zelle scheint im Kern zu sitzen, wahrscheinlich in der Chromatinsubstanz.
5. Die Bestrahlungen haben eine genetische Wirkung - Mutationen-, welche man chromosomalen Veränderungen zuschreibt (PLAEN).

Spezieller Teil

Ergebnisse und Methodik der Histochemie unter Strahleneinfluß

Wir sahen, daß die verschiedensten Disziplinen der Wissenschaft mit ihren genial ausgearbeiteten Methoden dazu beigetragen haben, das Zellgeschehen zu erforschen. Wollen wir mehr erfahren über die Reaktionsabläufe der Zelle und ihrer Bestandteile

im Normalen wie unter Einfluß der Strahlen, so bedürfen wir der Histo- und Cytochemie. Dieser Zweig der Histologie konnte sich in jüngster Zeit einen wichtigen Platz erobern, indem er bestimmte chemische Substanzen in Verbindung mit den Formelementen der Zelle und des Gewebes klar nachwies. Es bedurfte jedoch der modernsten Instrumente. Erst das **Elektronenmikroskop** und das **Phasenkontrastmikroskop** ermöglichten das Überschreiten der Wahrnehmungsmöglichkeiten der klassischen Instrumente. Nun kann man am Lebenden die bis dahin unsichtbaren Zellveränderungen ohne Färbungsmittel verfolgen, deren Einwirkungen notwendigerweise die wahre Struktur der lebenden Substanz verändern.

Weiterhin erlaubt die Mikrospektrochemie die Lokalisierung und die Dosierung nicht allein der Bestandteile der Zelle, sondern auch ihrer konstituierenden Elemente wie der Nucleolen, der Chromosomen usw.

Die röntgenologischen Methoden, welche bisher in der qualitativen und der quantitativen histochemischen Analyse verwendet worden sind, haben neue und wertvolle Informationen über die Zusammensetzung von Zellen und Geweben unter normalen und pathologischen Bedingungen geliefert. So darf man erwarten, daß das in Entwicklung begriffene **Röntgenmikroskop** tieferen Einblick in das Zellgeschehen gewährt. Neue Entwicklungen in der röntgenologischen Mikrodiffraktionstechnik werden der Forschung in der Ultrastrukturanalyse auf histo- und cytologischer Ebene ein weites Feld eröffnen (43). CASPERSON und seine Schule haben der Histochemie dadurch einen großen Dienst erwiesen, daß sie einen **Mikrospektrographen** von großer Präzision konstruierten. Mit seiner Hilfe war es möglich, das für jede Substanz existierende besondere Spektrum festzuhalten. CASPERSON beschäftigte sich hauptsächlich mit dem Studium der Proteine, der Aminosäuren und der Pentonucleinsäuren. Er benutzte bei seinen Forschungsarbeiten eine Cadmiumleuchtquelle mit den Strahlen von 2750 Å, 2570 Å und 2370 Å, die genau den Absorptionsmaxima der genannten Substanzen entsprechen, nämlich 2800 Å für die Proteine, 2600 Å für die Pentonucleinsäure und 2300 Å für die zyklischen Aminosäuren. Obengenannter Autor war nun in der Lage die verschiedenen Zellbestandteile isoliert zu studieren, den Kern, das Protoplasma die Nucleolen usw. und zuvor an verschiedenen Lebewesen, Pollen, Bakterien und Viren. Nachstehende Abbildung zeigt den Verlauf der Absorptionskurven der Zellelemente und gestattet somit, den großen Anteil der Proteine im Cytoplasma und Zellsaft festzustellen. Der Nucleolus enthält einen großen Anteil von Ribonucleinsäure und einen kleinen an Proteinen. Das Chromatin weist einen sehr großen Anteil von Ribonucleinsäure auf. Nach dem gleichen Prinzip gelang es CASPERSON, die chemische Konstitution der Zelle in verschiedenen Stadien der Teilung und der konstituierenden Elemente der Chromosomen usw. nachzuweisen. Er hat festgestellt, daß das Chromosom Euchromatin enthält, welches aus Proteinen und desoxyribonucleinsäure besteht, oder Heterochromatin, welches hauptsächlich Ribonucleinsäure

aufweist. Hieraus wiederum konnte CASPERSON Tatsachen von großem Interesse für die biochemischen Prozesse der Zellen ableiten. Wir wollen nun mehrere chemische Substanzen und ihre Reaktionen im Gewebe unter dem Einfluß ionisierender Strahlen verfolgen. Zu den wichtigsten gehören wohl die Nucleinsäuren (NA) Ribonucleinsäuren (RNA) und Desoxyribonucleinsäuren (DNA).

1. GROS und Mandel (62) untersuchten die Wirkung einer Ganzbestrahlung der Ratte auf die Nucleinsäuren der Milz. Es wird der Effekt einer einmaligen Ganzbestrahlung mit 500 r (180 KV, 1 mm Cu, FHA 50 cm, 10 r/min) auf die Milz von jungen männlichen und weiblichen Ratten untersucht. 59 Tiere wurden bestrahlt und 57 dienten zur Kontrolle. Beide Serien sind gleichmäßig nach Geschlecht, Alter, Wurf in einzelnen Gruppen aufgeteilt worden. Während der ersten 24 Stunden nach der Bestrahlung mußten alle Tiere fasten, hernach erhielten alle gleiche Kost. 40 Min., 12 und 24 Stunden, 2, 4, 6, 8, 11 oder 21 Tage nach der Bestrahlung wurden die Tiere gleicher Gruppen durch Aderlaß getötet. Die Milz wurde herausgenommen, gefroren, gewogen und chemisch untersucht. Die Nucleinsäuren bestimmten die Verfasser nach der Methode SCHMIDT und TANNHAUSER, den Phosphor nach TIVOLI, den Stickstoff nach KIELDAHL. Das quantitative Verhalten der DNA gibt dabei Aufschluß über Zerstörung und Aufbau von Zellkernen. Die Änderung der RNA und des Eiweißstickstoffes sind Ausdruck der gleichen Vorgänge im Zellplasma. 40 Min. nach der Bestrahlung zeigte sich eine deutliche Abnahme des Milzgewichtes, nur eine kleine Differenz des Eiweißes und nur sehr geringe Abnahme der DNA und RNA. 12 Stunden nach der Tötung konnte ein Gewichtssturz der Milz um 30%, ebenso starke Abnahme des Eiweißes, Rückgang der RNA um 45% und der DNA um 47% festgestellt werden. Der Tiefpunkt zeigte sich am 4. Tag mit einem Verlust der DNA um 75% und RNA um 50%. Nach 7 Tagen beginnt die Restitution. Um den 21. Tag waren DNA, RNA und Eiweiß über den Ausgangspunkt angestiegen. Eine deutliche Beeinflussung der DNA, RNA durch Röntgenstrahlen ist klar zu ersehen. Die Tatsache, daß sich 40 Min. nach der Bestrahlung nur geringe Veränderungen zeigten und am 4. Tage ein deutlicher Tiefstand eintrat, könnte man als einen erneuten Beweis von indirekter Strahlenwirkung deuten. THOMSON (172) und Mitarbeiter konnten bei der Wirkung von μ -Strahlen auf biochemische Prozesse der Rattenthymus ähnliche Feststellungen treffen. Die Tiere wurden mit 800 r einer CO^{60} -Strahlung behandelt. 3-12 Stunden nach Bestrahlung war der Nucleinsäurestoffwechsel leicht beeinträchtigt.

Bei einem Versuch über den Nucleinsäuregehalt von Thymuszellen bestrahlter und unbestrahlter C 57 Bl-Mäuse konnten andere Autoren (187) interessante Feststellungen machen. Sie bestrahlten junge Mäuse von C 57 Bl-Typ und teilten sie in drei Gruppen ein: eine unbestrahlte Kontrollgruppe, eine bestrahlte Gruppe, bei der eine Extremität geschützt wurde und eine dritte ungeschützt bestrahlte Gruppe. In verschiedenen Intervallen wurden sie getötet, um den Gehalt an RNA und DNA pro Zelle in Thymuszellsuspensionen zu bestimmen. Der DNA-Spiegel pro Zelle variierte nicht

merklich mit dem Alter oder der Behandlung. Die RNA-Werte blieben pro Zelle in der Kontrollgruppe die ganze Zeit über im wesentlichen konstant. Ein Anstieg der RNA pro Zelle um etwa das Dreifache, angefangen von einem bis zu 5 Tagen nach der Bestrahlung, und hernach ziemlich prompte Rückkehr zur Norm, wurde bei der geschützt bestrahlten Gruppe festgestellt. Im Gegensatz dazu blieben der RNA-Spiegel pro Zelle und das Verhältnis RNA/DNA während des ganzen Versuchsablaufes erhöht bei der ungeschützt bestrahlten Gruppe. Da die geschützten Tiere gegenüber der Entwicklung von Thymuslymphoid-Tumoren refraktär, die ungeschützt bestrahlten aber hochgradig empfindlich sind, wird angenommen, daß die Erhöhung des RNA-Gehaltes der Thymuszellen in fundamentaler Weise mit der Genese experimenteller Lymphoidtumoren zusammenhängt. In Parallelversuchen über das C 43 transplantierbare Lymphosarkom, bei denen normale Thymuszellen der C 57 Bl-Wirtsmäuse als Kontrollgewebe benutzt wurden, fand man eine Erhöhung des RNA-Spiegels pro Zelle bis 900% des Normalen. Der russische Forscher LARINOV (95) gibt eine Zusammenfassung über den Mechanismus der destruirenden Wirkung durchdringender Strahlen auf Normal- und Krebsgewebe. Der Ausgangspunkt dieser Untersuchungen war das Verhalten der Nucleoproteide bei der Radiotherapie des Lippencarcinoms. An Hand histodchemischer Methoden wurde festgestellt, daß die ersten Veränderungen an den vitalsten Krebszellen vor sich gehen, deren Kern und Cytoplasma hohen Nucleinsäuregehalt aufweisen. Bei der Bestrahlung von Rattensarkomen mit therapeutischen Dosen trat eine Aufspaltung der Desoxyribonucleoproteide in den Kernen in Eiweiß und freie Nucleinsäure auf, wobei letztere noch depolymerisierte. Gleichartige Veränderungen konnten bei der Bestrahlung von Milz und Dünndarm gesehen werden. Noch vor dem Auftreten destruktiver Vorgänge färben sich Schnitte von Milz und Dünndarm oder Geschlechtsdrüsen schlechter mit Fuchsin-schwefelsäure oder Pyromin, den Indikatoren für DNA bzw. RNA. In Leber, Niere und Gehirn zeigen sich derartige Veränderungen ebensowenig wie destruktive Prozesse (SEMENOV). Nach den Untersuchungen DIKOWENKOS findet in Übereinstimmung mit den Angaben HEVESYS unter dem Einfluß von Röntgenstrahlen eine beträchtliche Hemmung des Phosphatstoffwechsels, hauptsächlich der DNA, weniger der RNA statt. Diese Hemmung findet sich in den Organen, in denen auch die destruktiven Prozesse auftreten, z. B. Milz oder Knochenmark und nicht in Leber, Niere, Gehirn. Andere Untersuchungen mit markierten Verbindungen zeigten, daß nicht nur der Phosphatstoffwechsel der Nucleoproteide, sondern auch die Synthese der ganzen Nucleinsäuremoleküle gehemmt wird. PRESSNOW, aus dem gleichen Institut wie vorgenannte Autoren, wies in den strahlenempfindlichen Organen und Geweben unter Einfluß der Strahlen eine starke Steigerung der Gewebsphosphatase-Reaktivität (Phosphormonoesterase) nach. Die Erhöhung der Phosphatasereaktivität ist der Veränderung der Nucleoproteide parallel. Wesentlich für den Grad der Strahlenwirkung ist der Gehalt der bestrahlten Gewebe an Desoxyribonucleinproteiden und deren Stoffwechselgeschwindigkeit. Auch scheinen Desoxyribo-

nucleoproteide in einigen Organen Selbstfermentaktivität zu besitzen. Chemisch äußert sich das Absterben der Gewebe in einer Verminderung des Gehaltes an DNA. Grundlage der therapeutischen Wirkung durchdringender Strahlen ist die Eigenschaft der Kernnucleoproteide, unter bestimmten Bedingungen Veränderungen einzugehen.

Wie wir aus der Arbeit von SCHOLLES und WEISS (166) entnehmen können die die Wirkung von 30000 r Röntgenstrahlen auf die Lösungen von DNA und RNA untersuchten, wird bei der Bestrahlung Ammoniak und organisches Phosphat gebildet. Dabei steigt die Ausbeute an Ammoniak proportional zur Dosis an. Bei gleicher Dosis ist die gebildete Ammoniakmenge am größten bei Gegenwart von Sauerstoff, kleiner im Vacuum und am kleinsten in Gegenwart von Wasserstoff. Daraus folgt, daß die Freisetzung von Ammoniak durch die Wirkung der oxydierenden Radikale OH und HO₂ auf die Aminobasen zustandekommt. Dagegegen scheinen bei der Bildung von anorganischem Phosphat während der Bestrahlung sowohl die oxydierenden Radikale als auch Wasserstoff eine Rolle zu spielen, da man bei Lösungen von DNA die höchste Ausbeute an organischen Phosphat bei Gegenwart von Wasserstoff erhielt. Bei Bestrahlung von DNA-Lösungen verschiedenen Polymerisationsgrades erhielt man die höchste Ausbeute an Phosphat mit der Verbindung kleinsten Polymerisationsgrades.

Weitere Versuche über das Verhalten des Nucleoproteingehaltes stellten TILLOTSEN und CHIELDS WARREN an (182). Sie untersuchten die Veränderungen im Magen-Darmtrakt bei 200 gr schweren Ratten unter Ganzbestrahlung mit 700 r. In Zeitintervallen von einigen Stunden werden je 3 Tiere getötet und der Magen-Darmtrakt fixiert. Die Verfasser bestimmten durch histochemische Reaktionen in den Epithelzellen:

1. Desozyribonucleinproteide mit der Feulgen-Reaktion,
2. Nucleinproteide mit Toluidinblau und
3. die alkalische Phosphatase mit der Methode von GOMORI.

Es stellte sich heraus, daß die Epithelzellen des Dünndarms röntgenempfindlicher als die des Dickdarms, Magens und Oesophagus sind. Weiterhin sah man, daß in den ersten Stunden nach der Bestrahlung im Kern der Gehalt an DNA und an RNA sinkt. Im Nucleolus schwindet die alkalische Phosphatase. Nach 15 Stunden steigt der Gehalt an DNA langsam wieder an, der Phosphatgehalt im Kern und Nucleolus dagegen sehr rasch bis zu Werten über der Norm. In diesem zweiten Stadium, also 15 Stunden nach der Bestrahlung, sieht man morphologisch einen großen unregelmäßig begrenzten Nucleolus. Dieses Mißverhältnis von Kern zu Nucleolus normalisiert sich wieder im dritten Stadium, nämlich 6-20 Tage post irradi.: ebenso der Gehalt an DNA, RNA und Phosphatase. Die Autoren stellten fest, daß in diesem Fall die Vermehrung der Phosphatase die Synthese von DNA und RNA einleitete. Die Radiochemie stellte bisher eine Depolymerisation der Nucleoproteide durch Strahlen fest. Die obengenannten Autoren glauben vermuten zu dürfen, daß die beobachteten Veränderungen des Nucleoproteingehaltes sich nicht allein durch Polymerisation erklären lassen.

PAYNE, KELLY und ENTENMAN (137) untersuchten die Wirkung der Ganzkörperbestrahlung mit Röntgen auf Ratten und Mäuse. Mit Hilfe der Einverleibung von radioaktivem Phosphor (P^{32}) wurde die Einwirkung der Röntgenstrahlen auf die Bildung von Desoxypentosenucleinsäure, Pentosenucleinsäure, des Cytoplasmas und der Zellkerne der Leber im Tierversuch verfolgt. Die Verfasser bestimmten an 20 männlichen Sprague-Tawley-Ratten und an 8 weiblichen Long-Evens-Ratten sowie an 36 männlichen Mäusen die spezifische Aktivität der Nucleinsäurefraktionen. Die Ratten erhielten eine Gesamtdosis von 2500 r und die Mäuse 600 r, bei 250 KV, 0,5 mm Cu + 1 mm Al-Filterung. Das Futter wurde kurz vor Bestrahlungsbeginn entzogen, Wasser erhielten sie nach Belieben. Die Ratten wurden 24 Stunden nach Bestrahlungsende mit μ C Na_2 $HP^{32}O_4$ intraperitoneal injiziert und $4\frac{1}{2}$ Stunden später getötet. Die Mäuse erhielten 20 μ C Na_2 $HP^{32}O_4$ 20 Minuten nach Bestrahlungsende und wurden 2 Stunden später getötet. Nach der Tötung wurde die Leber sofort herausgenommen und gewogen. Zellkerne und Cytoplasma der Leber wurden isoliert. Durch Differentialzentrifugierung und Färbung der verschiedenen Nucleinsäuren (bzw. chemische Reinigung) wurde die spezifische Aktivität der einzelnen Nucleinsäurefraktionen mittels eines Victoreen-Geiger-Zellrohres gemessen. Es stellte sich heraus, daß die Einverleibung des radioaktiven Phosphors in die Pentosenucleinsäure des Zellkernes bei allen Zellen erhöht war, während die Desoxypentosenucleinsäure und Pentosenucleinsäure eine verminderte spezifische Aktivität zeigten. Bei den Sprague-Tawley-Ratten wurde ein Anstieg des Lebergewichtes beobachtet, welcher mit Zunahme der spezifischen Aktivität der Pentosenucleinsäure des Cytoplasmas übereinstimmte. Die Autoren vermuten die Möglichkeit eines Zusammenhanges zwischen Eiweiß und der Synthese der Pentosenucleinsäure des Cytoplasmas.

KELLY und PAYNE (85) stellten fest, daß der Einfluß der ionisierenden Strahlen auf die Synthese der DNA erwiesen ist; jedoch ist der zeitliche Ablauf der Hemmung für die einzelnen Organe verschieden. Mit Hilfe kleiner Gaben von P^{32} fanden die erwähnten Autoren 24 Stunden nach Totalbestrahlung von Mäusen mit 800 r den Gehalt an DNA der Leber auf 16%, der Niere auf 20%, der Milz auf 2,5% und der Lunge auf 5% gegenüber der Norm herabgesetzt. Der DNA-Gehalt des Dünndarms dagegen erreichte seinen Tiefpunkt schon unmittelbar nach der Bestrahlung. Diese Tatsache konnte von vielen Autoren bestätigt werden. Gaben die Verfasser 10 Tage vor der Bestrahlung Oestradiobenzoat, so konnte die Hemmung der DNA-Synthese auf die Hälfte verringert werden, was dafür zu sprechen scheint, daß die produktive Wirkung der oestrogenen Substanzen auf der Steigerung der polyferrativen Tätigkeit der Gewebe beruht. Organe nicht bestrahlter Tiere weisen 10 Tage nach der Oestradiolapplikation einen gegenüber der Norm deutlich erhöhten Gehalt an DNA auf.

Bei cytologischen und histochemischen Studien über Bestrahlungsreaktionen stellten SHIELD und Mitarbeiter (52) bei Anwendung von Röntgenstrahlen und Gefrier-

trockenmethode bei strahlenempfindlichen Zellen (Dünndarmepithel, Lymphknoten, Megakaryocyten der Milz, Mäusesarkom 180, Walkerrattencarcinom) von Ratten und Mäusen fest:

1. Große Kernvacuolen, die vielfach zum Zerreißen der Kernmembran führen;
2. bei weniger empfindlichen Geweben (Leber, Niere) sind die Vacuolen kleiner, ihr Inhalt wird aus dem Kern ausgestoßen, (Leber);
3. am Protoplasma waren keine deutlichen Veränderungen nachweisbar.

Im Ganzen kann gesagt werden, daß der Vacuolenbildung eine Abnahme der DNA parallel läuft.

Andere Autoren (153) bestrahlten Wistar-Ratten vom gleichen Wurf- 180-300 g schwer- mit Röntgenstrahlen. 40 Tiere erhielten je eine Bestrahlung 700 r (180 KV, 1 mm Cu, FHA 45 cm, 25 r/Min.): 24 Tiere erhielten eine Teilbestrahlung auf die 1k Extremitäten unter Schutz des übrigen Körpers durch Blei (172 KV, kein Filter, 200 r/Min.). 36 Tiere dienten als Kontrolle. Die Versuche wurden vom 2. bis 21. Tage nach der Bestrahlung ausgedehnt. Die Nucleinsäuren des Knochenmarks wurden nach der Methode von SCHMIDT-TANNHAUSER bestimmt, die Pentosen nach BIAL-MEJBAUM, die der Desoxypentosen nach DICHE. Die Purin- und Pyrimidingaben wurden durch UV-Absorption, der Phosphor nach BRIGGS festgestellt. Die Verfasser konnten folgende Ergebnisse bekanntgeben: vom 2. bis 14. Tag nach der Bestrahlung kommt es zu einem Abfall sowohl der DNA als auch der RNA. Von da ab erfolgt bis zum 21. Tage eine völlige Erhöhung. Bei der Teilbestrahlung sind die Veränderungen merklich geringer. Der Abfall beträgt bei der DNA 60% statt 75% „, bei der RNA 45% „statt 60%, und die Normalisierung erfolgt deutlich schneller. Diese Gegebenheit wird auf das Vorhandensein sekundär und allgemein ausgelöster Strahlenwirkung bezogen, die neben der direkten Einwirkung auf das Knochenmark besteht.

In einer anderen Arbeit (188) wurde die Wirkung der Röntgenstrahlen auf die NA des Lymphoidengewebes von C 57 black-Mäusen untersucht. Der Versuch wurde über 90 Tage ausgedehnt und nach 4, 30, 60 und 90 Tagen wurden die Nucleinsäuren und die Phosphorfractionen der Lymphknoten und der Thymus bestimmt. Es zeigte sich nach 4 Tagen ein Abfallen der DNA im Thymus um 60%; die Verminderung hielt bis zum 90. Tag an. Der RNA-Gehalt wurde durch die Bestrahlung nicht verändert. Nachdem die Verminderung des DNA-Gehaltes im Falle dieser Arbeit mit denen anderer Autoren übereinstimmt, wäre es interessant zu wissen, warum bei der RNA keine Veränderung festgestellt werden konnte.

Wieder andere Autoren (134) beschäftigte die Wirkung der Röntgenstrahlen auf Menge und Zusammensetzung der Nucleinsäuren in der Leber. 60 Mäuse werden nach einer 24-stündigen Hungerperiode einer harten Röntgenstrahlung von 600 r (Ganzbestrahlung) im rotierenden Käfig ausgesetzt. Die Kontrolltiere dürfen nach einer 24-stündigen

Hungerperiode 24 Stunden lang fressen und werden dann getötet, die Lebern zerkleinert und homogenisiert. Die angewandte Methode zur Bestimmung der Nucleinsäuren ist eine Modifikation der von SCHNEIDER (J. Biol. Chem. 161, 293, 1945) angegebenen Methode. In einer anderen Versuchsreihe werden 2 Gruppen von je 12 Mäusen 18 bzw. 48 Stunden nach Bestrahlung mit 600 r getötet. Die Nucleinsäuren werden isoliert (Modifikation der Methode von SCHMIDT und TANNHAUSER durch SCHNEIDER J. Biol. Chem. 161, 74, 1946) und nach Hydrolyse auf WAATMAN 1-Papier absteigend in 59% Isopropanol + 2,3 nHCl chromatographiert. 6 Stunden nach der Bestrahlung ist der Gehalt an Nucleinsäuren etwas abgesunken, er steigt in 12 Stunden erst an, um nach 10 Stunden erneut unter den Normalspiegel abzusinken. Danach nimmt er ständig zu. Auffällig ist, daß sich die DNA ähnlich verhält wie die RNA. Eine Umwandlung von einer Nucleinsäure in die andere kann nicht vorliegen. Die Verfasser glauben die Zunahme der Nucleinsäuretype durch beschleunigte Neubildung von Nucleotiden erklären zu können; oder aber die Veränderungen in der Leber veranlassen andere Organe, die Nucleinsäuren zu mobilisieren, wobei die Leber die Rolle eines Speichers übernehmen würde. Die Autoren konnten feststellen, daß sich die Zusammensetzung der beiden Nucleinsäuretypen unter der Bestrahlung nicht verändert, wie die quantitative Auswertung der Papierchromatogramme ergab.

Aufschlußreiche Ergebnisse erzielten KELLY und Mitarbeiter (83) bei Untersuchungen über den Einfluß des Zeitintervalles und der Strahlendosis einer Totalbestrahlung im Hinblick auf den Einbau von P^{32} in die DNA. Die Tatsache, daß bereits eine große Anzahl von Autoren die Hemmung der DNA-Synthese nach Bestrahlung bestätigen, gab Veranlassung, differenzierte Prüfungen mit verschiedenen Strahlendosen und unter Variierung des Zeitraumes zwischen Bestrahlung und P^{32} in Kooperation durchzuführen. Als Versuchstiere wurden Mäuse genommen; die Strahlendosen betrugen 300 r, 500 r, 800 r und 2500 r. Die intraperitoneale Injektion von $Na_2HP^{32}O_4$ erfolgte 2, 24 und 58^h p. irradi. Die Tötung und Untersuchung der Tiere wurde nach 2 bzw. 4 Stunden vorgenommen. Außerdem wurden ein strahlenresistenter Tumor (Mama-Carcinom) und das strahlensensible Lymphsarkom der Maus untersucht. Hier wurde auch die RNA geprüft, weiterhin erfolgten ergänzende histologische Untersuchungen und Mitosezählungen. Auch die spezifische Aktivität der DNA des Restkadavers (ohne Kopf und Haut) wurde bestimmt. Es zeigte sich, daß in allen Organen, allerdings in verschiedenem Ausmaß, ein Abfall der DNA-Werte eintrat, der meist, abgesehen von der Milz, von einem späteren, manchmal überschießenden Anstieg der Werte abgelöst wurde. Es zeigt sich eine deutliche Dosisabhängigkeit; entsprechend der Höhe der Strahlendosis sinken die Werte ab. Die Verfasser diskutieren an Hand der Literatur die Vorstufen der DNA und kommen zu dem Schluß, daß eine Schädigung derselben nicht wahrscheinlich ist. Wesentlich scheint ihnen vielmehr eine zelluläre Verschiedenheit der einzelnen Organe zu sein, deren Zellbild sich nach der Bestrahlung oft erheblich ändert und in denen die oft große Zahl untergehender Zellen ein Absinken

der DNA-Werte vortäuschen kann. Es wird eine spezifische Hemmung der DNA nicht in Abrede gestellt. Die Verfasser kommen aber auf Grund ihrer Versuche zu dem Schluß, daß die Strahlenwirkung an der Einzelzelle den Eintritt vieler Zellen in das wahrscheinlich in der Interphase gelegene Stadium der DNA-Synthese verhindert.

Bei Versuchen an lebenden Zellen mit Röntgenstrahlen konnte der italienische Autor PAOLETTI (135) ebenfalls feststellen, daß eine der primären Folgen der Bestrahlung in der Beeinflussung des Nucleinstoffwechsels und der Eiweißsynthese liegt. Andere (153, 74, 63) konnten ähnliche Ergebnisse erzielen, nicht nur mit Röntgenstrahlen, sondern auch mit chemischen Stoffen, wie 2,4- Dinitrophenol, Natrium-Pyrophosphat oder Adenyl-Pyrophosphat, wenn sie in dem in vitro gezüchteten Nährmedium zugesetzt wurden. Es läßt sich erkennen, daß durch diese chemischen Körper der Einbau des P^{32} sowohl in die DNA als auch RNA gehemmt wird.

ERRERA hat in einer hervorragenden Arbeit die Rolle der DNA im Zellgeschehen eingehend studiert. Es wurde gezeigt, wie sich die verschiedensten Arten von Veränderungen der DNA im Geschehen und Haushalt der Zelle auswirken. Dabei konnte festgestellt werden, daß jede Änderung eines einzelnen Zellgens notwendigerweise wichtige zelluläre Störungen nach sich ziehen muß. Es wurde der Versuch unternommen, aufzudecken, ob die Bestrahlung von Zellen, das Auftreten von Veränderungen derjenigen Zellbestandteile mit sich bringen, welche eng mit den Genen vergesellschaftet sind. Obengenannter Autor glaubt die Frage bejahen zu können. Ferner konnte durch Experimente an Zellen gezeigt werden, daß 2000 r Röntgen eine beträchtliche Veränderung des DNA-Komplexes dieser Zellen herbeiführen konnte. Als Versuchsmaterial wurde ein bestimmter Typ von Erythrozyten verwendet, bei denen der Kern aufgehört hat, sich zu teilen. Es wird angenommen, daß bei diesem das Chromatin viel stabiler ist als bei denjenigen Zellen, wo die mitotische Aktivität noch besteht. Allerdings ist die Natur des studierten Komplexes einstweilen noch nicht vollständig geklärt, jedoch ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß die DNA großen Anteil daran hat. Unter Einwirkung von UV-Strahlen konnte, ebenfalls auf Grund der spezifischen Affinität des Methyl-Grüns zum Zellkern, eine beträchtliche Veränderung der DNA festgestellt werden. An gereinigter DNA durchgeführte Experimente zeigten, daß bemerkenswerte Energien notwendig sind, um meßbare Wirkungen zu erzielen. Die Experimente bestätigen die Existenz mehrerer gleichzeitiger photochemischer Reaktionen (Verminderung der Viskosität, der Menge der pyrimidischen Basen, der Affinität zum Methyl-Grün, das wahrscheinliche Auftreten heterogener Moleküle, die weder dialysierbar, noch in Äthanol und Aceton löslich sind). Außerdem zeigt sich, daß die relative Widerstandsfähigkeit des studierten Komplexes die Unvollkommenheit der Analysemethoden widerspiegelt, die wahrscheinlich nur einen einzigen unter vielen anderen Veränderungstypen entschleiern. Die Tatsache, daß die Verminderung der Auslöschung auf 265 m μ eine Absetzungsstufe erreicht (die Auslöschung senkt sich

nur um 15-20% ihres Ausgangswertes), spricht zu Gunsten der Veränderung eines Bestandteiles, der nur bei ungefähr $1/50$ der optischen Dichte des Kerns vorkommt. Das Absorptionsspektrum des Kernes wird indessen nicht viel modifiziert (189). Daraus ist zu entnehmen, daß es sich um ein Nucleotid, vielleicht der RNA, handelt, welche, wie man weiß, allgemein weniger reichhaltig im Zellkern vorhanden ist als die DNA (191). Eine andere Hypothese wäre die der Heterogenität der DNA. BENDICH (15) konnte aus den Organen der Ratte, denen er markiertes, ameisen-saures Salz verabreichte (C_{14}) DNA isolieren, die er in zwei Bestandteilen fraktionieren konnte, welche sich durch die Geschwindigkeit der Einverleibung von C_{14} in das Thymin unterschieden, was tatsächlich auf eine gewisse Heterogenität hinweisen könnte.

Ein wichtiger Beweis zu Gunsten der Spezifität der DNA im Zellmechanismus ist zweifellos derjenige, welcher bei den Pneumococcen durch die, unter Zuhilfenahme von stark polymerisierter DNA veranlaßten Mutationen, erbracht wurde. AVERY (4) und BOIVIN (20) konnten diese Beobachtung beim *E. Coli* bestätigen. Wieder andere Autoren (194, 171) demonstrierten die Möglichkeit, beim Pneumococcen zwei aufeinanderfolgende Mutationen mit dem DNA-Präparat zu erzielen, was auf klare Weise ihre biologische Heterogenität aufzuzeigen scheint.

GERSHENZON (56) konnte bei der *Drosophila* eine Mutation erzeugen, indem er die Larven mit einer DNA enthaltenden Kalbsthymuskost ernährte und aufzog. Andere Unterschiede der Eigenschaften verschiedener Art von DNA sind noch von ZAMENHOFF (191) berichtet worden. Wir sehen also, daß jede noch so kleine Modifikation der Struktur der DNA oder der Nucleoproteide, an denen sie Anteil hat, notwendigerweise wichtige Zellumwälzungen nach sich zieht. Weiter sind wir der Ansicht, daß die Veränderungen dieser Säure bestimmte Strukturveränderungen zur Folge haben, welche wiederum Anlaß dazu geben, eine typische Zellschädigung nach Bestrahlung herbeizuführen.

Wie schon eingangs des zweiten Teils dieser Arbeit erwähnt, machte es erst die Entwicklung der **Ultraviolett-mikrospectrophotometrie** möglich (Casperson) (26), individuelle Zellen und Zellbestandteile in situ nach ihren chemischen Komponenten zu analysieren. Aber trotz augenscheinlicher Vorteile und Möglichkeiten solcher cytochemischer Verfahren welche eine direkte Correlation zwischen Strukturen und chemischer Zusammensetzung ermöglichen, ist die Zahl biologischer Objekte, die für Mikrospectrophotometrie geeignet sind, ziemlich beschränkt (Casperson) (27). Eine große Schwierigkeit für quantitatives mikrospectrophotometrisches Arbeiten am einem biologischen Material bildet die inhomogene Verteilung seines absorbierenden Materials. Obwohl Methoden wie die Gefrier-Trockentechnik die Inhomogenität intrazellulärer Komponenten zu vermindern scheint, ist das Problem auf keinen Fall zufriedenstellend gelöst (LEUCHTENBERGER (108)). Die erwähnte Verfasserin studierte die

Beziehung zwischen dem Kernvolumen, Beträge der intrazellulären Proteins und der DNA in verschiedenen Rattenzellen. So wurde Rattengewebe unmittelbar nach dem Tode der Tiere in 50% Formalin und Carnoylösung fixiert und Schnitte in verschiedener Dicke hergestellt. Die Berechnung von DNA und Protein geschah mittels cytochemischer photometrischer Methoden. Wie aus den Ergebnissen dieser Arbeit zu ersehen ist, gibt es drei verschiedene Klassen von DNA in den Leberkernen der Ratte, nämlich 3,3, 6,6 und 12,8. Die letztzitierten Autoren berichten, daß ihre Ergebnisse mit denen von RIS und MIRSKY (151) 1949 und LEUCHTENBERGER, VENDRELY und VENDRELY (106) 1951 übereinstimmen. Weiter wird berichtet, daß im Gegensatz zu den fast genauen Vielfachen von DNA in den Kernen (1 : 2 : 4) das Kernvolumen eine solche Vielfach-Verwandschaft nicht zeigt, sondern größtenteils in Mittelwerten variiert. Jedoch besteht eine Korrelation zwischen Kerngröße und dem Betrag von DNA pro Kern, wenn sich auch die Kerngröße innerhalb der DNA-Klasse beachtlich ändert. Von 36 Kernvolumen mit einem DNA-Inhalt von 6,6 pro Kern zeigten 28 ein Kernvolumen, das nur halb so groß oder noch kleiner war, als die übrigen Kerne. Die Unabhängigkeit der Kerngröße und des DNA-Inhalts ist also einleuchtend. Wenn man die Kernvolumen verschiedener DNA-Klassen miteinander vergleicht, so kommt es vor, daß 6,6 DNA pro Kern vorkommt in Zellen, die ein Kernvolumen aufweisen, wie die der 3,3 der 12,8 DNA-Klasse. Diese Tatsache stellte BIESELE 1944 (14) bei Rattenleberkernen fest. Es ist bekannt, daß ein Parallelismus zwischen dem Anteil des Proteins und der Kerngröße, wie dies in den Leberzellen und Spermatozyten gefunden wurde, besteht. Um zu sehen, ob eine solch nahe Verwandschaft zwischen der Größe der Kerne und dem Anteil des beinhaltenden Proteins auch in solchen Geweben besteht, in denen Zellen mit verschiedenen Funktionen vorkommen, prüften LEUCHTENBERGER und SCHRADER (167) die Magenschleimhaut der Ratte. Es ist bekannt, daß die Hauptzellen des Magens das Protein erzeugen, nämlich einen Vorläufer von Pepsin, während ein anderer Teil HCL erzeugt. Auf Grund der Tabelle (Tabelle 2 LEUCHTENBERGER) ist zu ersehen, daß die DNA pro Kern in den Haupt- und parietalen Zellen gleich ist. Weiterhin ist zu ersehen, daß obwohl die Kernvolumen in den parietalen Zellen größer sind als in den Hauptzellen, die letzteren einen größeren Anteil von Protein beinhalten. Es konnte bewiesen werden, daß sich ein strenger Parallelismus zwischen Proteinanteil und Kerngröße nicht aufrecht erhalten läßt für Zellen, die sich in der Natur ihrer synthetisierenden Wirksamkeiten unterscheiden, wie dies im beschriebenen Experiment der Fall ist.

LEUCHTENBERGER und VENDRELY (106) führten eine quantitative Schätzung der DNA an isolierten, individuellen Tierkernen mit Hilfe der **Ultramikrospectro**-Methode nach CASPERSON durch. Es wurde Material verwendet, welches in Hinsicht auf seine relative homogene Verteilung von absorbierenden Substanzen und infolge seiner chemischen Komposition geeignet ist für die quantitative Schätzung der DNA mittels der angegebenen Methode. Von frisch getötetem Rindvieh und Ratten wurden die

Kerne von Thymus, Leber und Spermien isoliert und der Gehalt an DNA bestimmt. Für die cytochemische Analyse wurde eine Mischung derselben isolierten Kerne und von Sperma eine Stunde in Glycerin suspendiert. Ein Tropfen dieser Suspension wurde an einem Quartschlitz angebracht. Es wurde die Absicht verfolgt, die Zahl der Kerne und das Sperma im Verhältnis zu der Menge des Glycerins sehr klein zu halten, so daß am Quartschlitz ein großer freier Raum neben dem Kern oder dem Samen waren. Die Verfasser weisen darauf hin, daß diese Technik Fehler ausschließt, die entstehen können durch eine mögliche Inhomogenität der photographischen Platte oder durch inhomogene Beleuchtung. Der Anteil an DNA pro Kern wurde mit Hilfe folgender Formel errechnet:

$$\text{DNA} = \frac{A}{E \cdot \text{Emg}}$$

A = Fläche, E = Auslöschung und Emg -- 20 entsprechend der errechneten Auslöschung einer Standardlösung der DNA von 1 mg pro 1 cm³ in cm Weg. Die Fläche der Kerne und Spermien wurde mit einem Planimeter gemessen, bei direkter Vergrößerung der Photographien dieser Objekte. Die DNA-Menge pro Kern wurde gemessen bei einer Absorption von 2570 Å. Es zeigte sich bei der DNA-Mengenbestimmung von individuellen Rinderleberkernen oder Stierspermen, daß die Mittelwerte bei der UV-Methode nach CASPERSON in guter Übereinstimmung stehen mit der chemischen Analyse (Tabelle 1). Die Vorteile, die sich beim Gebrauch von isolierten Kernen an Stelle von Gewebsausschnitten für die mikrospektrophotometrische Bestimmung der DNA ergeben, werden wie folgt zusammengefaßt:

1. Die Verteilung von absorbierenden Substanzen im isolierten Kerne in Glycerin ist bei weitem günstiger vom optischen Standpunkt aus als die Verteilung in Gewebsausschnitten desselben Materials. Die Differenz ist wahrscheinlich verursacht durch Fixierungsmittel.
2. Ein anderer Vorteil der Kernsuspensionen ist das Vorhandensein eines großen Raumes direkt neben dem Kern, was bei Hintergrundmessungen eine Rolle spielt und bei Gewebsausschnitten selten vorkommt.
3. Infolge des festgestellten Verlustes des Proteins der Kerne bei Isolationsverfahren (POLLISTER, LEUCHTENBERGER, (146) und infolge der kleineren Mengen von RNA kann die DNA aus den Auslöschungswerten berechnet werden.
4. Die Analyse von ganzen Kernen an Stelle von zerschnittenen Kernen vereinfacht nicht nur die quantitative Berechnung von DNA, sondern schließt auch die Fehler aus, die durch Messung der Dicke der Schnitte entstehen.
5. Die Möglichkeit, bekannte Maße, z. B. Stiersamen einer Kernsuspension, die analysiert wird, hinzuzufügen und die Kontrolle der cytochemischen Angaben durch eine chemische Analyse desselben Materials vergrößert die Genauigkeit der Ergebnisse.

In einer weiteren Studie versuchte dieselbe Autorin mit quantitativen cytochemischen Methoden den Veränderungen im Nucleinproteinaufbau während des Prozesses der

pycnotischen Kernreaktion im pathologischen und normalen Gewebe zu folgen. Wie schon in früheren Arbeiten festgestellt wurde, enthält der Zellkern in einigen Fällen beträchtliche Mengen von Pncto-(Ribose)-Nucleinsäuren und Lipoid, z. B. in Leberkernen (SCHNEIDER, STONEBERG (165, 170), dennoch besteht der Hauptteil des Chromatins von vielen Kerntypen hauptsächlich aus zwei Klassen von Substanzen:

1. der DNA, vielleicht in ziemlich konstanten und charakteristischen Mengen,
2. aus zahlreichen Proteinen in wechselnden Mengen, die aber immer die Nucleinsäure stark übersteigen (POLLISTER und LEUCHTENBERGER (147)).

Als besonders geeignet für dieses Experiment schienen die Kerne eines transplantierten Tumors zu sein, weil nämlich kurze Zeit nach der Transplantation eine ganze Reihe von verschiedenen Pycnosestadien innerhalb des Transplantationsgewebes beobachtet werden kann. Zu diesem Zweck wurde das Sarkom 180 mit der üblichen Troicarmethode erwachsenen, weiblichen weißen Mäusen subcutan transplantiert. Die Mäuse wurden in verschiedenen Intervallen nach der Transplantation (1-192 St) dann in absolutem Alkohol gewaschen und in auf 56-58° C erhitztem Paraffin eingebettet. Für das Studium der pycnotischen Degeneration von Kernen normalen Gewebes wurde die Mäuseleber ausgewählt und dabei im wesentlichen dieselbe Technik beibehalten. Zwecks cytologischer und histologischer Studien der Tumortransplantate wurden die Schnitte auf 6 μ angefertigt und mit Haematoxilin-Eosin, Methylgrün-Pyronin des Unna-Verfahrens und Jenner-Giemsa und Toluidinblau und der Feulgenreaktion gefärbt. Für die photometrischen mikroskopischen Messungen wurden die Schnitte auf 6,9 und 15 μ eingestellt und mit Methylgrün-Pyronin, Methylgrün allein der Feulgenreaktion und durch das Millon-Reagenz für das gesamte Protein gefärbt. Verfasser stellten als ideal drei Hauptforderungen auf, die erfüllt werden sollen, wenn man eine Färbung oder Farbreaktion für quantitative Absorptionsmessungen anwenden will:

1. Man muß eine solche Reaktion haben, bei der eine chemische Ausdeutung auf Grund von Kontrollexperimenten vernünftigerweise angenommen werden kann,
2. die spezifische Reaktion muß an cytologischen Präparaten gezeigt werden,
3. die Methode muß so standardisiert werden, daß sie genau reproduzierbar ist.

Bei dem Versuch stellen sich folgende cytologische Veränderungen heraus: die Kerne werden sphärisch, schrumpfen langsam, die Nucleolen gehen verloren und das Chromatin wird homogen. Als Endergebnis kann man feststellen:

- a) es gibt keine wirkliche Zunahme der Chromatinfärbbarkeit in pycnotischen Kernen
- b) Die Formveränderungen bei der Pycnose können auf eine niedrige Kernviscosität, welche die DNA-Depolymerisation begleitet, zurückgeführt werden.
- c) Das hochpolymerisierte Stadium der DNA kann von der Gegenwart irgendeines besonderen Proteins, möglicherweise des Histons, abhängen.

d) Die Pycnose kann dahin gedeutet werden, daß sie eine hohe proteotische Aktivität im Kern und eine verzögerte Nuclease-Aktivität zeigt.

Ferner zeigt sich gleich nach der Röntgenbestrahlung eine Veränderung des Nucleoproteinstoffwechsels. Die optische Dichte der Kerne (MITSCHALL (123) und die Affinität für das Reagenz von FEULGEN verringern sich, was einen niederen Gehalt an DNA anzeigt, sobald sich das Cytoplasma mit UV-absorbierenden Bestandteilen belädt. Vor kurzem vorgenommene biochemische Arbeiten (HOLMES 72, 73 HOWARD 196, KELLY 84) zeigen, daß schon 30 Minuten nach der Bestrahlung die Einverleibung von P^{32} , als Phosphat injiziert, sowie von C^{14} (C_1 sichtbar gemachtes Glyzin) in die DNS beträchtlich verringert wird. Diese Wirkung ist besonders klar bei im Wachstum befindlichen Tumoren; sie kann ebenfalls als Fernfirkung in den nichtbestrahlten Geweben eines Tieres, beobachtet werden, bei dem z. B. ein Tumor lokal bestrahlt worden ist. Es ist wahrscheinlich, daß dieser Effekt der Blockierung der Synthese der DNS in dem Augenblick auftritt, wo normale mitotische Figuren erscheinen. Die Erneuerung von C^{14} in RNS verschiedener röntgenbestrahlter Mäusegewebe verringert sich ebenfalls. Im Gegensatz hierzu bleibt sie aber bei den Proteinen normal.

Vom allgemein biochemischen Standpunkt aus ist als deutliches Ergebnis eine sehr rasch nach der Röntgenbestrahlung auftretende Verlangsamung der DNA-Synthese zu erkennen.

Vom theoretischen Standpunkt aus fragt man sich, ob es sich da nicht vielmehr um eine Wirkung, als um eine Ursache des Stillstandes der Mitosen handelt. Die Erneuerung von P^{32} oder die Einführung von sichtbarem Adenin in die DNA ist tatsächlich im allgemeinen um so bemerkenswerter, je größer die mitotische Aktivität ist (Festgestellt an normaler und in Regeneration befindlicher Leber (LEPAGE und HEIDELBERGER (102) MARSAL (118) BROWN (21)).

Wie wir sehen können, ist die Veränderung des Nucleinsäurestoffwechsels im Kern von sehr großer Bedeutung in jüngster Zeit. Vorzugsweise beschäftigt die Wissenschaft der Einbau verschiedener radioaktiver Substanzen in die DNA. Die Feststellungen von HOLMES (72) und von HEVESY (67) daß durch ionisierende Strahlen die DNA-Synthese empfindlich geschädigt wird, bestätigen sich an den verschiedensten biologischen Objekten (13, 178, 183, 47, 136, 138, 122). Vor allem ist der Einbau von P^{32} - Phosphat und C^{14} Format.

Weniger beeinflußt scheint die Base Adenin zu sein (136). LAYTHA und OLIVER betonen, daß die Synthesehemmung von dem jeweiligen Stand der Zellteilung abhängig ist, in dem sie sich während der Bestrahlung befindet. In Knochenmarkkulturen wird die Synthese unmittelbar nach 5000r gestoppt, auch in Zellen, die bereits mit Bildung von neuer DNA begonnen haben. Zellen, die sich in der Hälfte der Interphase befinden, beginnen wohl noch nach 5000r die Synthese, gehen dann aber rasch zu Grunde. Bei *Vicia faba* bauen bei noch kleineren Röntgendosen nur diejenigen Wurzelspitzenzellen keine DNA mehr auf, die sich am Ende der Interphase

befinden (138). In der Leber sinkt die DNA-Synthese niemals unter 50% der Kontrollwerte (122). Es werden also nicht alle Zellen geschädigt.

Die Hemmung der DNA-Synthese wird schon wenige Stunden nach der Bestrahlung beobachtet. Aber in den meisten Säugetierorganen steigt der DNA-Aufbau nach einigen Tagen wieder an; irreversibel geschädigt wird er nur in der Milz (83). Im Dünndarm geht die Erholung besonders rasch vonstatten. Parallel zur Mitoserate, die nach einem Tiefpunkt unmittelbar nach der Bestrahlung rasch wieder normale Werte erreicht, ist auch die DNA-Synthese nach wenigen Tagen wieder normal oder über die Norm gesteigert (189).

Therapeutische Gaben von Knochenmarkshomogenaten nach Bestrahlungen führen zu einer Überproduktion der DNA-Bildung (46). Die Befunde an den verschiedenen Säugetierorganen müssen jedoch mit Vorbehalt gedeutet werden (187), da sich schon bald nach der Bestrahlung die Zusammensetzung der Zellen ändert. So besteht die atrophierte Milz einer strahlengeschädigten Maus zu einem beträchtlichen Teil schon aus jungem Bindegewebe (Fibroblasten), das natürlich einen ganz anderen Nucleinsäurestoffwechsel hat als die ursprünglichen Milzzellen. Kelly und Mitarbeiter (197) möchten sogar einen großen Teil des herabgesetzten DNA-Aufbaues auf die Änderung der Zellpopulation zurückführen. Das würde allerdings die spezifische Hemmung der DNA-Synthese durch ionisierende Strahlen nicht ausschließen. Die DNA wird durch eine Bestrahlung auch direkt polymerisiert. Dies wird aus der Abnahme ihrer Viscosität nach Bestrahlung wahrscheinlich (39, 90, 17). Zumindest werden potentielle Bruchstellen gebildet. Die Abnahme des Nucleinsäuregehaltes im Knochenmark (168) und der Milz (25) pro mg Gewebe wird von CALI und ELLIS als sehr empfindliche Indication der Strahlenreaktion eines Tieres verwendet. Frühere Beobachtungen, daß die Synthese der Vorstufen der DNA ungestört verläuft, werden bestätigt (64). **Die Bestrahlung blockiert also nur die letzten Syntheseschritte der DNA.**

Wenn wir nun rückblickend zusammenfassen wollen, so müssen wir zugeben, daß noch viele Faktoren im Reaktionsmechanismus der Zelle im Dunkeln liegen, jedoch konnten wir an Hand der zur Verfügung stehenden Literatur, die noch nicht so zahlreich ist auf dem Gebiete der Radiohystochemie, einige Punkte feststellen, die mehreren Forschungsarbeiten gemeinsam sind:

1. Deutliche Abnahme der DNA und RNA nach Bestrahlung.
2. Absinken der DNA, bzw. RNA mit steigender Strahlendosis.
3. Hemmung des Phosphatstoffwechsels der DNA, weniger bei RNA.
4. Starke Steigerung der Gewebephosphataktivität läuft parallel der Veränderung der Nucleoproteide.
5. Histologisch: Bildung von Kernvacuolen bis zum Zerreißen der Membrae, bei Verminderung der DNA.
6. Chemisch äußert sich das Absterben der Zellen in der Verminderung an DNA.
7. Absinken der Viscosität.
8. Wird vermutet, daß die therapeutische Wirkung der Strahlen auf der Tatsache beruht, daß die Nucleoproteide unter gewissen Bedingungen Veränderungen erleiden.

Außerdem wird angenommen, daß eine Heterogenität der DNA besteht und die Mitoseaktivität und DNA-Synthese in Beziehung zueinander stehen (Blockierung der Mitose, Hemmung der Synthese).

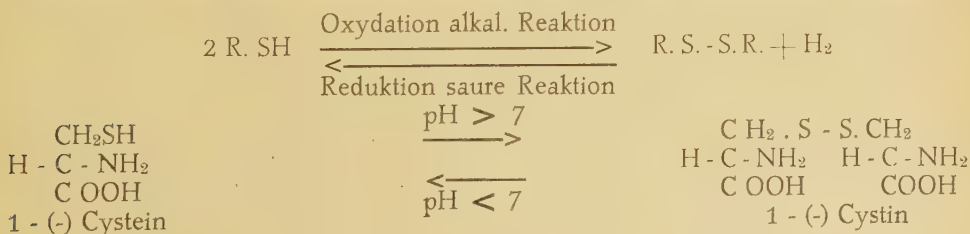
Theoretisch möchten wir glauben, daß die Strahlenempfindlichkeit der verschiedensten Gewebe und Organe mit der Stabilität oder Labilität der DNA in Verbindung steht.

2. Sulfohydriole

Die zweite wichtige Gruppe, der wir uns beim Studium der histochemischen Resultate zuwenden wollen, sind die Sulfohydrikkörper. Die Sulfohydrikkörper (SH-Körper) sind in der Form des Cystein und Glutathion als Gewebs- SH-Körper längst bekannt. Sie wirken allgemein entgiftend und als reversibles Redoxsystem (5, 38, 50, 60): weiterhin dienen sie als Aktivatoren einer Reihe von Fermenten. Die Bernsteinsäureoxydase (75) und die Adenosintriphosphatase (30) wurden als SH-Gruppen tragende Enzyme bekannt. Zahlreiche in vitro-Versuche beschäftigten sich mit dem Verhalten der SH-Körper unter Einfluß von Röntgenstrahlen und im Zusammenhang mit Fermentuntersuchungen. Die rasche Inaktivierung von Fermentlösungen unter Strahleneinfluß war von DALE und BARRON gefunden und es hatte sich gezeigt, daß die sulfohydrihaltigen Enzyme besonders rasch durch die ionisierenden Spaltprodukte des Wassers gehemmt werden. Andere Autoren (87, 108, 69) konnten feststellen, daß die strahlenbedingte Oxydation durch Verabreichung von Glutathion und Cystein rückgängig zu machen ist. Die Arbeiten von FRICKE, DALE, LEA, LATARJET u. BARRON zeigen uns die beträchtliche Schutzwirkung, welche fremde Substanzen gegenüber den Enzymen in Lösung bei ionisierender Bestrahlung ausüben. Die Verknüpfung der AH-Körper mit dem lebenswichtigen Fermentstoffwechsel und die auffallende Strahlenschutzwirkung dieser Körper auf der anderen Seite gaben den Anreiz dazu, deren Verhalten im tierischen Organismus zu untersuchen. Man ist versucht anzunehmen, daß in vitro zahlreiche für die Zellwirtschaft unwertliche Metapoliten als schützende Agentien gegenüber den wichtigsten und edelsten Zellbestandteilen handeln können (ERRERA, S. 81). Ferner ist von Interesse zu untersuchen, welches die spezifischen Moleküle sind oder die wesentlichen enzymatischen Systeme, von denen gewisse Bestandteile in vivo durch die Bestrahlung modifiziert werden können. Es konnte sehr bald bestätigt werden, daß zahlreiche Proteine eine sehr große Radioresistent besitzen, wenn sie in vivo bestrahlt werden. Außerdem hat man gefunden, daß einige spezifische Enzyme bei der Bestrahlung in vivo radioresistent waren. Sehr eindrucksvoll sind die Beispiele der Katalase (48), der Arginase (54) und der Desoxydribonuclease (48). Weniger klar ist das Bild bei den komplizierteren enzymatischen Systemen; hierbei spielt die Zelloxydation eine große Rolle. Lange Zeit hat man die Respiration für resistent gegenüber Röntgenstrahlen gehalten (131) (132). Jedoch konnte festgestellt werden, daß sie durch Röntgenstrahlen stimuliert werden kann (Erythrozyten) (6). Im Falle der Hefe hat man eine leichte Verringerung der exogenen Respiration beobachtet. Während die Oxydation von Zellsubstraten (endogene Respiration) mehr stimuliert wird. Die Röntgen-

bestrahlung verzögerte die Reduktion des Cytochroms C desselben Mikroorganismus MARTIN (119), doch dauert dieser Effekt nur einige Minuten an. In Gegenwart bestimmter Substrate können die Fermentation und die Respiration aufhören, was übrigens nicht gleichzeitig der Fall sein muß. CRABTREE (29) und GRAY haben gezeigt, daß schon 1000r in einigen Minuten die Produktion von Milchsäure in den Retinagewebe verringern können, obwohl die Respiration nicht verringert wird. GISE (59) und SWANSON haben eine Verringerung der Glucosefermentation durch Hefe gefunden. HOLMES (71) fand, daß die Milcheshydrogenase der Zellen in Kultur gestoppt wird, wobei diese Wirkungen an die Inaktivierung des Co-Enzyms I. durch strahlen gebunden zu sein scheint. BARRON (9) fand kürzlich eine Verminderung der Respiration durch Röntgenstrahlen, und zwar im Falle der durch die sulfohydrierten Enzyme (Milch- und Bernsteinhydrogenase) katalysierten Oxydationen. Diese Wirkung ist besonders deutlich in Bezug auf Heuschreckeneier, deren Respiration schon bei 10r aufhört. Es ist wahrscheinlich, daß diese Aktion das Ergebnis der intrazellulären Oxydation der SH-Gruppen ist. LE MEY (101) konnte gewisse Resultate von BARRON (10) bezüglich der Aufhebung von Bernsteinhydrogenase der Rattenniere nicht bestätigen, andere Autoren berichten ähnliches. Von den edlen Elementen der Zelle wissen wir jedoch, daß die Enzyme mit SH-Radikalen am empfindlichsten sind, daß gewisse Polymeren sich unter Einwirkung der Bestrahlung auflösen.

Ein anderer Autor (76) konnte bei histochemischen Untersuchungen an der Nebenniere beobachten, daß den Wasserstoffionenkonzentrationen eine sehr große Bedeutung beim Ablauf sämtlicher Fermentreaktionen zukommt. Die Fähigkeit der Röntgenstrahlen, pH-Verschiebungen im Blut und Gewebe hervorzurufen oder zu beeinflussen, ist eine der wichtigsten biologischen Wirkungsmechanismen dieser Energieart. Durch die pH-Verschiebungen wird die Hemmung und Förderung vieler fermentgesteuerter Prozesse ermöglicht. Auf Grund der Tatsache, daß eine lokale Bestrahlung zu pH-Verschiebungen des Gesamt-Organismus führt, wird eine Deutung mancher chemisch bedingter Allgemein-Fernwirkungen leichter. Sehr wichtig ist die pH-Reaktion für die biologischen Redoxsysteme. Eine große Bedeutung kommt innerhalb des Organismus dem — als Redoxsystem funktionierenden — Aminosäurepaar Cystein und Cystin zu. Durch Oxydation von Cystein verschwindet die SH-Gruppe und wird durch eine Disulfid-Gruppe ersetzt. Das Gleichgewicht zwischen diesen beiden Gliedern und die Richtung des Reaktionsablaufes hängen vom pH des umgebenen Mediums ab.



Ein ähnliches System ist das SH- und SS-Glutathion, das eine wichtige Rolle im intermediären Stoffwechsel spielt. Die günstige Wirkung des Cysteins im Organismus ist also nur an die SH-Gruppe gebunden. Es ist wahrscheinlich, daß diese Gruppe bereits die Ausbreitung der primären chemischen Reaktion, die sich als Folge einer Strahlenabsorption einstellt, verhindert und somit eine weitere Auswirkung des Treffers auf die chemischen Vorgänge in der Zelle und darüber hinaus unmöglich macht. Wenn nun das körpereigene Cystein nicht ausreicht, d. h. durch anhaltende Einwirkung der Strahlen verbraucht ist, entwickeln sich weitere Schädigungen der Zelle und des Organismus. Daraus können wir ersehen, daß die SH-Gruppen tragenden Fermente und Enzyme auf das Engste mit dem Stoffwechselgeschehen der Zellen und speziell sogar mit dem des Kernes verknüpft sind.

Bei Untersuchungen über das Verhalten der SH-Körper der Milz von Mäusen (161) konnte festgestellt werden, daß ein deutlicher Strahleneinfluß auf die SH-Substanzen besteht. Nach 3 Tagen zeigte sich eine sichtliche Erniedrigung der Werte, nach 7 Tagen eine Erhöhung und nach 14 Tagen wieder eine annähernde Normalisierung. Die ersten Veränderungen in der Sulfohydryllokalisation zeigen sich bereit bei einer Röntgendosierung von 20 r nach 3 Stunden. Die Zellen haben ihre runde Form teilweise verloren und weisen gewisse Schrumpfungen auf. Der Cytoplasmasaum ist mehr durch intensivere Blaufärbung (nach der Methode von Chevremont und Frederic) erkenntlich. Die diffuse Blaufärbung der Zellen ist aber noch deutlich. Auch nach Bestrahlung mit 800 r konnte man noch aktive SH-Gruppen nachweisen. Auf Grund des raschen Zellzerfalls traten diese Stoffe aus der Zelle und dem Plasma aus und fanden sich im Interstitium. Abb. Kl. Wo. 603. Verfasser nehmen an, daß die Sulfohydrylgruppen der Fermente und des Co-Enzyms A biologisch bedeutend wichtiger sind, als das mengenmäßig viel häufiger vorkommende Gluthation oder Cystein.

Diese biologische Wichtigkeit der die SH-Gruppen tragenden Fermente und Enzyme spielt nach Ansicht anderer Autoren (93) in der indirekten Strahlenwirkung eine große Rolle. Es wird angenommen, daß die Enzyme und Fermente, die mit einer SH-Gruppe besetzt sind, durch die heran-diffundierenden Zersetzungsprodukte des Wassers, (die anorganischen Peroxyde, Poly- und Depolymerisationsprodukte) stark geschädigt werden. Da die lebenswichtigen Funktionen dieser SH-Gruppen tragenden Enzyme für die Zelle wichtig sind, kann schon eine kurze Hemmung ihrer Aktivität zu bedrohlichen Veränderungen des Reaktionsablaufes der Zelle führen. Bei solchen Störungen ist es möglich, daß es zur Entstehung toxisch wirkender Produkte kommt, die ihrerseits wiederum eine Reihe von Reaktionssystemen im Organismus beeinträchtigen und deren Versagen herbeiführen. Wir wissen jedoch aus neueren Arbeiten, daß sich die Menge der freien aktiven SH-Gruppen im Blut und Gewebe nach einer tödlich wirkenden Bestrahlung nicht wesentlich verändert (162). Ebenso wird das Co-Enzym A, welches mit seiner freien SH-Gruppe die verschiedensten Vorgänge im Energiestoffwechsel katalisiert, durch eine Bestrahlung nicht unmittelbar geschädigt. (173, 86, 88).

3. Enzyme und Fermente

Von sehr großer Bedeutung für die biologische Strahlenwirkung ist das Verhalten der Enzyme. DALE, welcher eingehende Untersuchungen über die Wirkung der Röntgenstrahlen auf Enzyme durchführte, fand, daß diese Substanzen sehr strahlenempfindlich sein können, wenn bestimmte Bedingungen erfüllt sind. Eine besondere Rolle spielen die Konzentrationen der Enzymlösung, sowie ein bestimmter pH-Wert. FORSSBERG (199) (zit. n. LANGENDORFF), welcher die Röntgenstrahlenwirkung auf das Enzym Katalase im besonderen untersuchte, kam zu ähnlichen Ergebnissen. Bei Verwendung von hochverdünnten wässrigen Lösungen kristallisierten Enzyme erwies sich das Enzym unter „Standardbedingungen bestrahlt, sehr strahlenempfindlich, so daß schon 5 bis 10r genügte, das Enzym Katalase merklich zu inaktivieren. Jede Veränderung des pH oder des Gasgehaltes in der Lösung ließ die Stabilität des Enzyms stark ansteigen. Als sehr stabil erwies sich die Katalase dann, wenn der wässrigen Enzymlösung Gelatine beigegeben wurde. Außerordentlich hohe Strahlendosen (mehr als 100000r) sind notwendig, wenn dieses Enzym in vivo inaktiviert werden soll. Roth und Mitarbeiter (155) konnten keine Veränderung der Katalase der Leber bei mit 600r total bestrahlten Mäusen feststellen. Gleiche Feststellungen konnten bei Lipase, Cholinoydase und Katepsin gemacht werden. Die Anthinoxydase zeigt bis zum 8. Tag einen leichten Anstieg ihrer Aktivität. KUNKEL und PHILLIPS (91) studierten das Verhalten der Cholinoydase der Leber von bestrahlten Ratten in Bezug auf die endogene Atmung. Es wurden Strague-Dawley-Ratten von 250-325 gr mit einer 170 kv Röntgenröhre bei 1 mm Al-Filter und 0,5 mm Cu-Filter, 45 r/min, im Abstand 25 cm bestrahlt. Nach dem Versuch wurde die Leber oder Niere sofort entfernt und in Eis gebracht. Eine gewogene Probe wird in 5 Vol eiskaltem 0,039 M Natrium- und Kaliumphosphatpuffer bei pH 7,3 homogenisiert. Das Homogenisat wird durch Gaze dekanziert und die Enzymaktivität im Warburg-Atmungs-Apparat bestimmt. 1 cm³ des 16,7 prozentigen Homogenisats in 1 cm³ dest. Wasser werden mit 10 mg Cholinchlorid versetzt. Die innere Atmung der Gewebe wird durch einen Vergleichsversuch ohne Zusatz von Cholinchlorid bestimmt. Die Differenz beider Ergebnisse zeigt die Cholinoydaseaktivität. Bei einer Bestrahlung von 50-50 Min. mit 400r war kaum ein Unterschied gegenüber den unbestrahlten Tieren festzustellen. Wurde mit 800-1400r bestrahlt, so war das Aktivitätsmaximum deutlich geringer als bei nichtbestrahlten Tieren. Die innere Atmung der Gewebe dagegen ist merklich vergrößert innerhalb der ersten 10 Minuten und bleibt bei hoher Bestrahlungsintensität (800-1400r) auf diesem Wert. Es fand bei 800 - 1400r in 45 Min eine Erhöhung der inneren Atmung um 73-95% gegenüber den Kontrollen statt. Ferner stellte sich heraus, daß die Zunahme der inneren Atmung nach γ -Bestrahlung bei kleineren Strahlungsintensitäten reversibel ist und in einigen Stunden den Normalwert erreicht hat. Bei Anwendung letaler Strahlungsdosen ist dieser Effekt nicht mehr reversibel. Es geht offensichtlich mit der Erhöhung der inneren Atmung eine Verringerung der Cholinoydaseaktivität einher.

Das Enzymsystem der Mäusemilz unter Röntgeneinwirkung studierten ASHWELL und HICKMANN (2). Es wurden 6-7 Wochen alte männliche NIH-Mäuse mit 640 r (LD_{50}) einzeitig Röntgen-ganz-bestrahlt (200 KV, 20 mA, 0,25 mm Cu + 0,51 mm Al-Filter, FHD 50 cm, 62-66 r/min). 4 Stunden bis 11 Tage nach den Bestrahlungen wurden an Milzhomogenaten die Aktivität geprüft von:

1. Respiratorischen Enzymen,
2. Alkalischen Phosphatasen,
3. Aeroben Phosphorylierungsfermenten.

zu 1.) Es zeigte sich keine Veränderung der Bernsteinsäure-Dehydrogenase oder der Cytochromoxydase. Gleiche Ergebnisse konnten andere Autoren bei den Oxydationsfermenten wie: verschiedenen Dehydrogenasen (130, 94, 157, 78, 70, 130), Cytochromoxydase u. Diphosphorpyridimunnucleotid bekanntgeben (44). Diese Fermente werden selbst durch hohe Röntgendosen nur geringfügig oder überhaupt nicht geschädigt.

zu 2.) Die Aktivität der Adenosintriphosphatase 5-Nucleotidase und β -Glyceronphosphatase nimmt zu, obwohl deren Absolutmenge infolge der strahlenbedingten Milzverkleinerung abnimmt.

zu 3.) Die aeroben Phosphorylierungs-Vorgänge werden ganz erheblich gehemmt. PETERSON und Mitarbeiter (140) untersuchten die Aktivität der Phosphatasen in strahlenempfindlichen Organen mit letalen Dosen an Hand der Hydrolyse von Adenosin, Triphosphat und 5-Adenylsäure und konnten eine Zunahme der Aktivität feststellen. In der folgenden Arbeit (141) sollte eine Dosis-Abhängigkeit u. a. durch Anwendung der LD_{50} geprüft werden. Die Untersuchungen an Milz und Thymus der Ratte zeigten tatsächlich im Bereich von 25-600 r eine deutliche Dosisabhängigkeit der Strahlenwirkung. Nach 24 Stunden ergab sich etwa bei Anwendung von 25, 50 und 100 r eine Zunahme der Fermentaktivität von 20%, 50% und 88%. Der Gipfel der Reaktion lag um den 3. Tag, die Rückkehr zur Norm erfolgt bei 50-200 r in zwei bis drei Wochen. Zwecks Klärung von vegetativen Gleichgewichtsverschiebungen als Folge einer Ganzbestrahlung wurde der Einfluß von Röntgenstrahlen auf die Aktivität der Cholinesterase auf ganzbestrahlte Mäuse untersucht (116). Die Cholinesteraseaktivität wurde im Serum mit titrimetrischer Methode festgestellt. Als Maß für die Aktivität diente die Menge der verbrauchten 0,01 Na OH in 5 Minuten. Im einzelnen wurden Dosen von 250, 500 und 1000 r verabreicht (250 KV, 15 mA, Th 1 Filter, 50 cm FH Abstand.). Bei unbestrahlten Tieren traten Schwankungen der Cholinesteraseaktivität um $\pm 20\%$ auf. Nach Bestrahlung mit 250 r waren keine Änderungen der Cholinesteraseaktivität während des ersten Tages festzustellen. Nach dem 3. Tag war die Variationsbreite nach oben und unten vergrößert. Bei 500 r Ganzbestrahlung war die Cholinesteraseaktivität nach 24 Stunden um 60% erniedrigt. 1000 r Ganzbestrahlung führten bei der Mehrzahl der Versuchstiere zu einer Herabsetzung der Cholinesteraseaktivität um 20-50%. Ein Versuch, bei dem die Tiere mit Cystein vorbehandelt wurden,

zeigte, daß bei Bestrahlung mit 500r innerhalb der ersten 24 Stunden kein Abfall der Cholinesteraseaktivität eintritt. Die Autoren nehmen auf Grund ihrer Versuchsergebnisse an, daß die Beeinflussung des vegetativen Gleichgewichts durch Röntgenstrahlen wenigstens zum Teil auf eine Hemmung der Cholinesterasetätigkeit zurückzuführen ist und sprechen von einem indirekten Strahleneffekt.

SCHMIDLING-MESZAROS (104) untersuchten die Enzymaktivität des Homogenats von Leber (C 57-Mäuse nach Zugabe der Substrate des Zitronensäurezyklus (Krebs-Zyklus). Es wurde festgestellt, daß:

1. nach Bestrahlung mit 5000 und 20000 r (180 KV, 6 MA, 1 mm Cu) stellte sich eine Verminderung der Enzymaktivität eines Leberhomogenats mit niedrigem Stickstoffgehalt (5,0 - 5,3 mg N/ccm 25% Leberhomogenat) ein.
2. Leberhomogenate mit hohem N-Gehalt (6,2 bis 6,9 mg N/ccm) besitzen eine große Enzymaktivität und sind röntgenresistenter.
3. Die Enzyme des Zitronensäurezyklus sind vermutlich SH-Enzyme, die besonders strahlenempfindlich sind.
4. Diese SH-Enzyme können vor Röntgenschädigung durch Sättigung mit Substraten oder durch die vermehrte Anwesenheit von leicht oxydablen Stoffen, wie Cystein und Glutathion, geschützt werden.

Die Aktivität der Desoxyribonuclease ist nach einer Bestrahlung erhöht (89, 49). Ebenso steigt die Ribonucleaseaktivität unmittelbar nach der Bestrahlung an, fällt aber dann am 3. Tag unter die Norm. In der zweiten Woche werden wieder normale Werte gemessen. Die Störung ist also unspezifisch und wahrscheinlich als eine sekundäre Stoffwechselstörung zu deuten (153). Ähnliche und charakteristische Schwankungen konnten LUNDIN und Mitarbeiter (114) bei der Cholinesterase feststellen.

MASS, HOHNE und KUNKEL (117) stellten das Verhalten von Enzymen des Kohlenhydratstoffwechsels nach Röntgenbestrahlung fest. Es wurden die Aktivitäten der Enzyme: Glukose — 6 — Phosphatdehydrase, Aldolase, Glyzerophosphatdehydrase, Phosphoglyzeraldehyddehydrase, Phosphoglyzeralkinase, Mulizsäuredehydrase, Glutaminsäuredehydrase, Bernsteinsäuredehydrase, Äpfelsäuredehydrase und Adenosintriphosphatase nach einzeitiger Bestrahlung des Gewebshomogenats aus Rattenleber mit 4000 r getestet. Selbst bei den z. T. hochempfindlichen SH-Fermenten Phosphoglyzeraldehyddehydrase, Glutaminsäuredehydrase, Äpfelsäuredehydrase, Bernsteinsäuredehydrase und Adenosintriphosphatase war unmittelbar nach der Bestrahlung kein Inaktivierungseffekt im Gewebshomogenat nachweisbar. Verfasser glauben eine Erklärung vorhergehender Ergebnisse in den Untersuchungen mit isolierter Glutaminsäure- und Alkoholdehydrase zu finden, bei denen sie durch Zusatz von hochverdünnten Leberhomogenaten, eiweißfreien Extrakten und von Acetontrockenpulveraufbereitungen aus Rattenlebern vollständig von der Strahleninaktivierung geschützt werden.

4. Mastzellen

MAZZA (121) untersuchte die histochemischen und morphologischen Veränderungen der Mastzellen des Mesenteriums und des braunen intercapularen Fettgewebes von weißen Ratten nach Röntgenbestrahlungen. Es wurden 18 Tiere einmalig mit 1000 r bestrahlt (180 KV, 8 mA, FHA 30 cm, Filter 0,5 Cu und a Al). Das abdominale Bestrahlungsfeld betrug 6 cm x 8, das intercapulare 2 cm x 2. Am 3. Tage wurden mit den bestrahlten Tieren 6 Kontrolltiere geopfert. Die Gewebsschnitte wurden nach Carnoy-POLLISTER fixiert. Bei der Färbung, die mit Toluidin-Blau in absteigender Konzentration durchgeführt wurde, ergab sich bei bestrahlten Tieren eine lebhaftere Metachromasie. Ferner hatte der Autor den Eindruck, daß die Mastzellenzahl anstieg. Eine stärkere Aufsplitterung der metachromatischen Körner ist sicher. Auffällig ist ihre Vermehrung in den benachbarten Gefäßwänden. Gleiche Feststellungen konnten mit der Unna-Pappenheimfärbung (mod. n. CERIOTTI) getroffen werden. Mit genannter Färbungsmethode wurden außerdem Kernveränderungen wie: Pyknosen und Vacuolen beobachtet. Mit der Färbung nach Hotchkiss konnten keine Unterschiede zwischen bestrahlten und unbestrahlten Tieren gesehen werden. Der Autor konnte eine ganz neue Beobachtung machen, er stellte fest, daß eine bedeutende Vermehrung von Polysacchariden (Glykogen) in den Fettzellen der bestrahlten Tiere stattfindet.

Ein anderer Autor (128) studierte das Verhalten der Mastzellen der menschlichen Haut nach Bestrahlung mit 1500-3000 r harten Röntgenstrahlen (Filterung Cu, Al). Die Präparate wurden in Alkohol und basischem Bleiacetat fixiert. Die Mastzellfärbung wurde nach HOLMGREEN, WIELANDER und JERPES durchgeführt. Es stellte sich heraus, daß nach der Bestrahlung die Mastzellen diffus in der Haut verteilt sind. Die hämorrhagischen Phänomene im Anschluß an Röntgeninsulte werden mit den metachromatischen Granula der Mastzellen in Verbindung gebracht. Diese werden durch die Bestrahlung ausgestoßen und sollen infolge ihrer Heparinen-Natur (anti-coagulierende Natur) das hämorrhagische Bestrahlungsphänomen bedingen. Da aber die Heparingenese dabei inhibiert wird, stellen sich wieder normale Blutverhältnisse ein und die Hämorrhagie hört auf.

DOUGLAS, SMITH und LEWIS (38) untersuchten die Gewebsmastzellen von jungen CF 1 Mäusen nach Ganzbestrahlung. Bestrahlungsbedingungen: (250KV, 26,7cm FHA, HWS 1,6 Cu 225 r/min). In den ersten 3 Tagen konnten gegenüber den unbestrahlten Kontrollen keine Unterschiede gefunden werden. Nach 3-5 Tagen nahmen die Veränderungen an Zahl und Ausdehnung zu. Man fand: Zusammenballungen cytoplasmatischer Granulationen, metachromatische oder farblose Vacuolen, abnorm gestaltete Zellen mit unterbrochenen Zellgrenzen bei intaktem Zellinhalt! oder geplatze Zellen, bei denen Granulationen außerhalb der Zellen lagen. 30-35 Tage nach der Bestrahlung hat sich das Bild wieder normalisiert. Die Autoren setzen ebenfalls die Veränderungen mit den Homorragien und der Blutungshemmung beim Strahlensyndrom in Beziehung.

KELENYI (200), der ebenfalls die Veränderungen der Mastzellen nach Röntgenbestrahlung untersuchte, konnte feststellen, daß die metachromatischen Granula Heparin enthalten, außerdem eine Peroxydase und alkalische Phosphatasefärbung zeigen und ferner in der Thymusdrüse zunehmen. Auch dieser Autor nimmt an, daß der erhöhte Heparinspiegel und die erhöhte Blutungsneigung mit der Bestrahlung im Zusammenhang stehen. Bei der Untersuchung der morphologischen Schädigungen des subcutanen Bindegewebes sowie Teilen des Mesenteriums von Ratten, die mit 600 - 1000 r bestrahlt wurden, konnte KELENYI sehen, daß die Zahl der geschädigten Zellen sehr variiert, selten aber mehr als 10-15% beträgt, die Granula, die normalerweise 0,5-3 μ groß sind, deutlich Verklumpungen zeigten und später eine Größe von 3-8 μ aufwiesen. Die gleichzeitige Bestimmung der Gerinnungszeit bei einem Teil der Tiere ließ eine direkte Beziehung zwischen deren Verlängerung und dem Grad der morphologischen Mastzellenveränderungen erkennen. Versuche an adrenektomierten Tieren führten zum gleichen Ergebnis wie die Bestrahlung von Normaltieren.

5. Knochenmark

Die biochemischen Wirkungen einer Bestrahlung des Knochenmarks und ihre Beziehungen zu den morphologischen Veränderungen verfolgte THOMSON (174). Die Versuche wurden am Knochenmark der Kaninchentibia durchgeführt. Als Strahlenquelle dienten 150 mg Co^{60} - Chlorid. Die Dosis betrug 310 oder 620 r (155 r/min). Mittels Differentialzentrifugierung in 0,25 molarer Rohzuckerlösung wurde die Gewebshomogenisierung und Fraktionierung nach der Schneiderschen Methode durchgeführt. Die DNA und RNA wurden teils nach SCHNEIDER teils nach SCHMIDT-THANNHAUSER, die Phosphatase nach FISKE und SUBARROW, der Stickstoff nach MIRKO KJELDAHL, nach KOCH-MC MEELIN bestimmt. Außerdem werden die Succindehydrogenase-Aktivität nach SCHNEIDER und POTTER und die thromboplastische Aktivität nach CHARGOFF untersucht. Die histologische Fixierung der Präparate wird mit Formalin, die Färbung mit Giemsa durchgeführt. Die mit 310 r bestrahlten Tiere werden nach 12 Stunden bis 2 Wochen getötet, die mit 620 r bestrahlten nach 12 Stunden, 48-72 Stunden. Bei beiden Dosen zeigt sich im Homogenisat eine Abnahme der DNA RNA Konzentration. Durch die Aufteilung in die einzelnen Zellfraktionen läßt sich nachweisen, daß die Gesamtzellzahl im Knochenmark abnimmt, der DNA-Gehalt im Kern aber gleich bleibt. In den Mitochondrien, den submikroskopischen Partikeln und der überstehenden Schicht nimmt RNA fortschreitend ab. Im Vergleich zu den histologischen Befunden konnte gezeigt werden, daß der RNA-Rückgang durch eine relative Verringerung der Knochenmarkszelltypen bedingt ist, die im Plasma wenig RNA enthalten. Die Succindehydrogenase-Aktivität verändert sich nicht signifikant. Die thromboplastische Aktivität der submikroskopischen Partikeln nimmt zwar im Ganzen ab, bezogen auf den N-Gehalt bleibt sie sich aber gleich.

BURSTONE (24) führte histochemische Studien an bestrahlten Knochen von jungen Mäusen mit P^{32} durch. 7 Tage nach der Phosphorgabe wurden die Untersuchungen

durchgeführt. Es interessierte vor allem die Knochengrundsubstanz der chemisch verwandten Vorläufer in den Zellen. Mit der Schiff-Methode nach HOTCHKISS wurden die Kohlehydrate und Glucoproteide dargestellt. Durch Einwirkung verschiedener Enzyme oder anderer Reagenzien auf die Gefrierschnitte wurde eine Differenzierung in Mono- und Polysaccharide, Glykogen, freie Aldehyde und Proteinlipoidkomplexe versucht. Auch Hyaluronidase und Kollagenase wurden benützt und Phosphatasefärbungen und Calciumphosphatnachweis nach KOSSA-GERSCH (Silbernitrat-Reagenz + UV-Licht) durchgeführt. Nach der Zerstörung des Knochenmarks kommt es später zum Ersatz durch abnorme reticuläre Zellen. Diese enthalten mehr Glykoprotein, Glykogen und alkalische Phosphatase als normale Zellen. Zur gleichen Zeit bildet sich eine glykoproteinreiche Grundsubstanz aus, die verkalkt und unreife Knochen bildet. Diese Grundsubstanz ist verschieden von der normalen und weist ein niedriges polymerisiertes Glykoprotein auf. Die Tätigkeit dieser reticulären Zellen wird vom Verfasser als reparativer Prozeß gedeutet.

Die Wirkungen einer Ganz-Körper-Röntgenbestrahlung auf die langen Röhrenknochen von Hamstern, etwa 6 Wochen und 9 Monate alt, untersuchten LEVY und RUGH (109). Eine Gruppe wurde mit 1500 r bestrahlt, die andere kontinuierlich bis zum tödlichen Stadium. Die Gewebeproben wurden, bevor die Atmung und der Kreislauf aussetzten, entnommen. Dieses Stadium wurde gewöhnlich nach 3 Stunden bei 184 kV Spitzen-spannung und 30 mA mit gegenübergestellten Röhren ohne Außenfilter erreicht. Die Dosisleistung betrug dabei 510 r/min in 35.5 cm Abstand in Luft, die Gesamtdosis bei alten Tieren 110000 r, bei den jungen 80000 r. Es zeigte sich eine Verminderung der Osteoplasten, Hämorrhagien und Ödeme im Mark. Degeneration der haemato-poetischen Zellen. Bei den 1500 r Tieren die 3 Stunden später getötet wurden, sah man neben Vasodilation ebenfalls Hämorrhagien und Ödeme im Mark. Bei Tieren, die 3-4 Tage überlebten, zeigte sich Markfibrose mit Spindelzellen und vaskulären Endothelzellen, welche das degenerierende Mark ersetzten.

SCHERER, RINGLEB und VENTZKE (100), die den Einfluß der Röntgenstrahlen auf den Nucleolar-Apparat des Knochenmarks der Milz und des Ascitestumors studierten, stellten fest, daß der gesamte Nuclearapparat zunahm. Es werden nicht nur die einzelnen Nucleolen größer, sondern auch deren Zahl nimmt zu. Die Vergrößerung des Nuclearapparates wird von den Autoren als Folge einer Fermenthemmung durch die Bestrahlung aufgeläßt. Sie nehmen an, daß die ionisierenden Strahlen die Reduktion der RNA zur DNA hemmen.

Bei cytologischen Knochenmarksuntersuchungen von Mäusen unter Strahlenschutzmittelzuführung und anschließender Röntgenbestrahlung konnte ein anderer Autor (201) folgende Feststellung treffen: Die bekannten Strahlenschutzstoffe Cysteinhydrochlorid (10 mg), Thiocholinchlorid (0,3 mg i. v. 2 mg i. p.), Thioharnstoff (18 mg),

Ascorbinsäure (10 mg), Methylenblau (0,2 mg i. v.) und Vitamin B₁₂ ließen keinerlei signifikante Wirkung auf die Häufigkeit chromosomaler Strukturveränderungen erkennen. Bei einer anderen Gruppe von Tieren, die unter Sauerstoffmangel bestrahlt wurde, sah man eine deutliche Abnahme gegenüber den Kontrolltieren und zwar von 63% auf 34%. Der Autor vertritt den Standpunkt, daß die ionisierenden Strahlen eine zweifache Wirkung auf die Zelle ausüben.

1. Eine Wirkung auf die cytoplasmatischen Enzyme
2. eine spezielle Wirkung auf die Chromosomen mit resultierenden Chromosomenbrüchen.

Weitere histochemische Studien

VERGA und CALI (179) stellten histochemische Untersuchungen auf die Mucopolysaccharide der Nabelschnur unter Einfluß von Röntgenstrahlen an. Sie bestrahlten 5 cm lange, ganz frische Stücke Nabelschnur mit 140, 400, 700, 1400, 2800, 3100, 4100, 6100 und 7100r (150 kV, 3 nA, FHA 40 cm, 3 Al). Die Gewebsschnitte wurden teils mit einer neutralen 10% Formollösung, teils mit Carnoy'scher Flüssigkeit fixiert. Mit wässriger Toludin-Blau-Lösung (0,1%) und nach HALE wurden die Präparate gefärbt zum Studium der Metachromasie. Bis zu einer Dosis von 4100r fanden die Autoren keine nennenswerten Unterschiede zu den Kontrollen. Mit 6500r findet man eine Abschwächung bei der Farbreaktion, die mit 6100 und 7100r viel ausgesprochener wird. Die spezifische Grundsubstanz der Nabelschnur verliert also durch eine intensive Röntgenbestrahlung ihre charakteristische Metachromasie und zwar wahrscheinlich durch Depolymerisation. Eine Aktivierung eines im Gewebe enthaltenen Enzyms (Mesomucinase) halten die Autoren bei den angewandten Dosen für ausgeschlossen.

BURSTONE (23) betrieb histochemische Studien am normalen und bestrahlten Speicheldrüsengewebe der Maus. Zwanzig 2 Tage alten Mäusen wurden subcutan in Nachbarschaft der linken Submaxillaris eine Suspension von radioaktivem Chromphosphat (ca $1/40 \text{ cm}^3$ 15 μ CP³²) injiziert, die im Gewebe liegen bleibt und lokal bestrahlt wird. Als Kontrollen wurden Tiere verwendet, die nicht behandelt wurden oder eine nicht-radioaktive Chromphosphatsuspension injiziert bekamen. Nach 7 Tagen wurden die behandelten Tiere getötet und histologisch untersucht. Zum Studium der Glykoproteine wurde die Perjodsäure-Schiff-Methode nach HOTCHKISS verwendet. Die Jodsäure oxydiert gewisse Hydroxylgruppen der Glykoproteine zu Aldehydgruppen, die bei der Anfärbung gewisse Farbreaktionen hervorrufen. Auf Grund des Verhaltens dieser Methode konnten die Verfasser Unterschiede in dem Verhalten der Sublingualis und Submaxillaris bei den normalen und bestrahlten Speicheldrüsen feststellen. Es zeigte sich, daß die Submaxillaris stärkere Veränderungen aufwies, also strahlenempfindlicher ist.

Zusammenfassung

Die Arbeit bringt nach kurzer Einleitung eine Definition über Histochemie unter Strahleneinfluß.

Anschließend werden die Grundlagen der Histochemie, Fixierung und Färbung beschrieben und die wichtigsten Färbungsmethoden im Prinzip aufgeführt.

Die quantitativen Bestimmungsmethoden unterliegen noch schärfster Kritik, in Bezug auf die Auswertung der Präparate ist daher bislang noch eine gewisse Skepsis und Zurückhaltung angebracht.

Weiterhin wird die Wirkung der Strahlen auf biologische Systeme geschildert, wobei festgestellt werden kann, daß sich in den letzten 4-5 Jahrzehnten in grundlegenden Punkten nichts änderte.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wird die Strahlenwirkung auf NA, RNA und DNA beschrieben. Es zeigt sich ein deutliches Absinken bei der DNA, weniger bei der RNA, was sich histologisch in Vakuolenbildung bis zum Zerreißen der Membran äußert. Es wird angenommen, daß von der Stabilität oder Labilität der DNA die Strahlenempfindlichkeit der verschiedensten Gewebe abhängt.

Im Anschluß wird auf die Sulfhydryle eingegangen, die in Verbindung mit Fermenten und Enzymen eine wichtige Rolle im Stoffwechselgeschehen spielen. Geringe Rö-Dosen rufen schon deutliche Veränderungen in der Sulfhydryllokalisation hervor, die Zellen verlieren ihre Form und weisen Schrumpfungen auf.

Die Enzyme und Fermente sind in vivo strahlenresistenter als in vitro.

Ferner wird die Wirkung der Strahlen auf die Mastzellen geschildert. Die Haemorrhagischen Phänomene im Anschluß an Röntgeninsulte werden mit den metachromatischen Granula der Mastzellen in Verbindung gebracht.

Abschließend werden noch Einzeluntersuchungen aufgeführt. Die Arbeit zeigt, daß auf dem Gebiete der qualitativen Histochemie sehr viele brauchbare Methoden ausgearbeitet wurden, doch wäre es sehr vorteilhaft, wenn eine Einheitlichkeit angestrebt würde, da sonst ein Vergleich von Ergebnissen sehr erschwert wird.

1. Altmann, In: Hoppe (Seyler) Thierfelder: Handbuch der physiologisch- u. pathologisch-chemisch. Analyse. Bd. 2 Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 10. Aufl. 1955
2. Ashwell G. u. J. Hickmann - Proc. Soc. Exper. Biol. u. Med. 80, 407 (1952)
3. Astaurov B.-L. Zhur. Obstrchei Biol. 8, 421 (1947)
4. Avery O.T. Mec.Leod C.-M. et Mec.Carthy M.-J.J. exper.Med. 79, 137 (1944)
5. Bacy Z. M. et Nerve Bull. Acad. med. Belgique 17, 13 (1952)
6. Back A. Block Frankenthal L. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 66, 366 (1947)
7. Barron, Dickmann S., Muntz J. A., Singer T. P. J. gen. Physiol 32, 537 (1949)
8. Barron E. S. G. u. Mitarb. J. Gen. Physiol. 32, 537, 595 (1949)
9. Ders. E. S. G. Gosvoda u. Flood V. Biol. Bull 97, 1499 (1944)
10. Ders. E. S. G. Nelson L. u. Ardao M. I. J. Gen. Physiol. 32, 179 (1948)
11. Beadle G. W. Chem. Rev. 37, 15 (1945)
12. Ders. G. W. Amer. J. Bot. 33, 788 (1946)
13. Becarevic AD., Kacanski K. J. and Mancu Bull. Inst. Nucleas Sci. Broris, Kidrick
14. Biesele J. J.-Cancer Res. 4, 529 (1944)
15. Bendich A.-Abstr. Amer. Chem. Soc. Boston, P. 11 C (1951)
16. Bergonie J. u. Tribondeau L. C. R. Soc. Biol 57, 400 (1904)
17. Bernstein M.-H.-Nature 174, 463 (1954)
18. Bethe, A.-Beitr. Chem. Physiol. Pathol., 6, 399 (1905)
19. Bishop D.W.-Genetics 27, 132 (1942)
20. Boivin A., Delaunoy A., Vendrely R., u. Lehonlt Y.-Experientia 1, 334 (1945)
21. Brown G. B.-Ciba Sympos. 174 (1951)
22. Brown G. B. J. Cell a. Comp. Physiol 38, suppl. 1, 121 (1951)
23. Burstone MS.-Anat. Rec. 115, 543 (1953)
24. Ders. MS. Amer. J. Path. 29, 1133 (1953)
25. Cale L. J. and Ellis M.-Cancer Res. 14, 738 (1954)
26. Casperson T. Skand. Arch. Phys. 73, Suppl. 8 (1936)
27. Casperson, -Cellgroth and cell funktion, Norton Co (1950)
28. Cox S. F.-Arch. exper. Zellforsch. 11, 121 (1931)
29. Crabtree H.-H. u. Gray L.-H.-Brit. I. Radiol 12, 39 (1939)
30. Cronkite E. P. u. Mitarb. - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 76, 456 (1951)
31. Dale W. M. - zit. n. Lea, Actions of Radiol on Living Cells. Cambridge (1947)
32. Ders. W. M. - Brit. I. Radiol. suppl. 1 (1947)
33. Darcy A. R. - Soc. Biol 104, 1055 (1930)
34. Ders. A. R. - Protoplasma 14, 497 (1932)
35. Davis B. D. - Geneticś., 35, 661 (1950)
36. Darlington C. A. u. C. L. F. La Cour - I. Genet. 46 (1946)
37. Demerec M. u. Latarjet R. - Gold. Spring Harb. Symp. 11, 38 (1946)
38. Dixon A. u. Mitarb.-Biochemic I. 21. 844 (1927)
39. Drew R. M. Rad. Res. - 3, 116 (1955)

40. Duryee W. H. - Biol. Bull 93, 206 (1947)
41. Ders. W. H. - I. nat. Cancer Inst. 10, 735 (1949)
42. Duspiva, In: s. l. Hoppe, Seyler, Thierfelder 10. Aufl. 2 Bd
43. Engström, - Physiological Reviews Vol 33 (1953)
44. Eichel H. J., u. M. A. Spirtes - Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 88, 412 (1955)
45. Ererra M. S. S. 81
46. Erickson C. A., R. K. Main u. L. J. Cole Rev. Nucl. Sc. 5, 413 (1950)
47. Evans T. C. and K. H. Lu Rad. Res. 3, 224 (1955)
48. Euler u. Hevesy G. Kgl. Dansk. Vict. Gehsh. Biol. Med. 17, 3 (1942)
49. Felase, V.M., J. Meeschan, P. L. Day u. C. D. Douglas -
Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 87, 231 (1954)
50. Fischer u. Mitarb. - Bull Soc. Chembiol. Paris 32. 1009 (1950)
51. Fischer A.-Strahlenther. 40, 54 (1931)
52. Frederick W., Tillotsen u. Shields Warren: Cancer Res. Inst. New. England
Deaoness Hosp. Boston Radiology 61, 349-60 (1953)
53. Fricke H., - Gold Spring Habor Symp. 6, 164 (1938)
54. Frossberg A.-Arch. Chem. Miner. Geol. 21a, No. 7 (1945)
55. Gates P. L. - Science 77, 350 (1933)
56. Gershenzon S.-M., Zil'Berman, O.-L. Levochkina, P. O. Lit'ho, u. N.-D.
Tarnavsku - Zhur. Obschei Biol., 9, 69 (1948)
57. Gherarducci D.-Bull. Soc. ital. Biol. sper 29, 1493 (1953)
58. Giles N.-H u. E. Z. Lderberg - Amer. I. Biol. 35, 150 (1948)
59. Gise A. C. u. W. H. Swanson - I. cell comp. Physiol 30, 283 (1947)
60. Green D. E. - Biochemik J. 27, 678 (1933)
61. Grass W. u. H. Lohaus - Unters. über die Wirkung von Härtungsflüssigkeiten auf
tierische Gewebe Z. u. M. Bd. 17
62. Gros Ch. M. u. J. Mandel, - belge. Radiol 35, 357-59 (1952)
63. Harrington H. u. P. S. Lavik Federat. Proc. 12, 214 (1953)
64. Dies. Arch. Biochem. Biophys. 54 (1955)
65. v. Hevesy G. - Rev. mod. Phys. (1945)
66. Ders. - Adv. Enzymol. 7, 111 (1947)
67. Ders. - Nature (London) 163, 869 (1949)
68. Ders. - J. Chim. Phys. 48, 275 (1951)
69. Hemmet F. S - Protoplasmy (Berl.) 15, 422 (1932)
70. Hertwig O. - Arch. mikrosk. Anat. 77, 1 (1911) zit. n. Ererra
71. Holmes B. E.-Biochem. J. 29, 2285 (1935)
72. Ders. - Brit. I. Radiol. 20, 450 (1947)
73. Ders. - Brit. I. Radiol. 22, 487 (1949)
74. Ders. u. K. Mee - Brit. I. Radiol. 26, 326 (1953)
75. Hopkins F. G. u. E. J. Morgan - Biochem. J. 32, 611 (1938)
76. Hornykiewytch T. - Strahlenther. 86, 194 (1952)

77. Ders. u. G. Seydl - Strahlenther. 84, 489 (1951)
78. Höhne G., H. A. Kunkel u. H. Maas - Klin. Schr. 33, 567 (1955)
79. Dies. Naturwiss. 42, 488 (1955)
80. Jäger zit. n. Romeis B. mikr. Technik München (1948)
81. Kaplan R. W. Naturwiss. 37, 547 (1950)
82. Keller
83. Kelly L. S., J. D. Hirsch, G. Beach u. A. H. Payne Radiation Res. 2, 490 (1955)
84. Ders. u. H. B. Jones, Proc. Soc. exper. Biol. Med. 74, 493 (1950)
85. Ders. u. A. Payne, Federat.-Proc. 12, 76 (1953)
86. Kenneth X. P. Dubois, G. J. Cotter u. P. E. Petersen, Radiation Res. 2, 79 (1955)
87. Kinsey V. E. I. Biol. Chem. 110, 551 (1935)
88. Koch R. u. Hagen - III. Intern. Congr. f. Biochem. Brüssel (1955)
89. Kowlessar O. D., K. J. Altmann u. L. H. Hepelmann Nature 172, 867 (1953)
90. Krizin A. M. u. E. V. Budilova Akad. Nauk SS. R. N. S. 98, 961 (1954)
91. Kunkel H. O. u. P. H. Phillips Arch. Biochem. Biophys. 37, 366 (1952)
92. Labow L. W., V. M. Mosley u. R. W. G. Wykoff Bioch. et Biophys. Acta 5, 327 (1950)
93. Langendorff, R. Koch und H. Sauer, Strahlenther. 93, 178 (1954)
94. Ders. u. U. Hagen Experantia 11, 485 (1955)
95. Larinov L. F. Festn. Röntgenol. 1954 H. 2, 3-6 zit. n. Brodersen
96. Lajthas L. G. und R. Oliver, Symposium of Radiobiology of Liege 1. 9. 1954
97. Latarjet R. C. R. Ac. ad Sci 228, 1354 (1949)
98. Ders. u. E. C. R. Ephrati Soc. Biol. 142, 497 (1948)
99. Lea D. E. Action of Radiol. Cambridge New York Mc. Millen (1947)
100. Ders.
101. Le May M. Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 77, 337 (1951)
102. Lepage G. A. u. Ch. J. Heidelberger I. Biol. Chem. 188, 593 (1951)
103. Leuchtenberger C., Chromosima 3, 6 (1950)
104. Ders. Chromosima 3, 449 (1950)
105. Ders. R. Vendrely u. C. Vendrely Proc. Nat. Acad. Sci 37, 33 (1951)
106. Dies. Proc. Nat. Acad. Sci 37, 33 (1951)
107. Leuchtenberger C. u. F. Schrader Biol. Bull 101, 95 (1951)
108. Ders. R. Leuchtenberger, C. Vendrely und R. Vendrely, Exper. Cell. Resarch
Nr. 1 (1952)
109. Levy B. M. und R. Rugh Amer. I. Roentgenol. 67, 974 (1952)
110. Lieb M. Genetics 35, 121, 673 (1950)
111. Lipp W. Histochemische Methoden R. Oldenburg-München
112. Lison L. Bull Histol. Appl. 25, 23 (1947)
113. Loeb, J. Proteins and the Theory of Colloidal Behaviour. 2nd Ed. New York (1924)
114. Lundin S. J., C. J. Clemedson u. A. Nelson, Intern. Congress de Biochemie, Brüssel
115. Luria S. E., C. R. Acad. Sci. 209, 604 (1939)

116. Lüdhy H., I.-Radiol. clin. 22, 491 (1953)
117. Maas H., G. Höhne u. A. H. Kunkel, Hamburg, 37. Tag Dtsch. Röntgengesellsch.
16.—18. Oktober 1955
118. Marshak A. J.-Gen. Physiol 35, 275 (1941)
119. Martin L. G. R.-Soc. Biol. 140, 1201 (1946)
120. Mazia D. u. H. J. Hirshfield Exp. Cell. Res. 2, 59 (1951)
121. Mazza A. Radioterap. 3, 9, 3—9 (1954)
122. Mee L. K. Intern. Conferences of Radiobiology Cambridge (1955)
123. Mirchell I. S. Brit. J. Radiol 16, 339 (1943)
124. Montgomery P. O. B. u. W. Shields 117, 589 (1953)
125. v. Möllendorf W. Unters.z.Theorie der Färbungen fixierter Präparate
126. Muller H. J.-Science 66, 84 (1927)
127. Naylor EE. - Amer. I. Bot. 13, 265 (1926)
128. Novaro A. Radioterap. 8, 69—74 (1952)
129. Odenthal F. u. K. Sievers, Strahlenth. 91, 278 (1953)
130. Oster R.-H.-J. gen. Physiol 18, 71 (1934)
131. Oster G. u. Mc. A. D. Laren I. gen. Physiol 33, 25 (1950)
132. Pachard C.-Radiology 45, 528 (1945)
133. Packer u. J. Scott, techn. Meth. u. Bull int.Ass. med 22, 85 (1945)
134. Paigen K. u. B. Kaufmann I. Cellul. Gomp. Physiol. 42, 163 (1953)
135. Paoletti M. - Nuntius radiol. 21, 325 (1955)
136. Passonneau J. V. u. J. R. Totter Radiation Res. 3, 304 (1955)
137. Payne A. H., L.S.Kelly u. C. Entenmann - Proc.Soc. Exper.Biol.Med. 81. 698 (1952)
138. Pelc S. R. u. A. Howard Radiation Res. 3, 135 (1955)
139. Powell W. F. u. E. Pollard Radiation Res. 2, 109 (1955)
140. Petersen D.F., J. Dervin u. K. P. Dubois I. Pharmacol. Exper. Therap. 106. 410 (1952)
141. Dies, Fed. Proc. 12, 356 (1953)
142. Pischinger A. - Z. Zellf. 26, S. 249
143. Ders. 3. 169 (1926) 5. 347 (1927)
144. Policard A. - La fixation froide. C. R. Assoc. Akad. S. 41—47
145. Pollister A. W. Rev. a'Haem. 5, 527 (1950)
146. Ders. u. C. Leuchtenberger ibid 35, 66 (1949)
147. Dies, Proc. Nat. Acad. Sci. 35, 166 (1949)
148. Dies, u. H. Ris Gold-Spring-Habor Sympovia 12, 141 (1947)
149. Potten Br. M. u. R. Philpott Anat. Rec. Bd. 20
150. Pulcher C. Boll Soc. Ital. Biol. Sper. 2, 223 (1927)
151. Ris H. u. A. E. Mirsky I. Gen. Phys. 33, 125 (1949)
152. Robbins W. J.-Univ. of Missoure Std. 1, 3 (1926)
153. Rodesch J., G. Jaudel, B. Chirpaz u. P. Mandel Experientia Basel 11, 437 (1953)
154. Roessle R. Preuss. Akad. Wissensch. 3, 22 (1936)

155. Roth J. S., H. J. Eichel, A. Wase, C. Alper u. M. J. Boyd Arch. Biochem. Biophys. 22, 95 (1953)
156. Ryan F. J. u. J. Lederberg Proc. Nat. Akad. Sci. 32, 163 (1946)
157. Ryser, Albi u. Zuppinger: Experientia X, 304 (1954)
158. Seligmann A. M., H. H. Chauncey u. M. M. Nachlass: Stain Technol 26, 19 (1951)
159. Simon S Arch. Biol. 50, 95 (1939)
160. Scherer E., D. Ringleb u. E. L. Ventzke Strahlenther. 90, 41 (1953)
161. Scherer E., u. W. Gebhardt Klin. 32, 603 (1954)
162. Scherer E. Klin. Schr. 34 (1956)
163. Schleip W. - Arch. Zellforsch. 17, 289 (1923)
164. Schmidlin u. Meszaros, I. Forschr. Röntgenstr. 81, 76 (1954)
165. Schneider W. I-Biol. Chem. 161, 292, 303 (1954)
166. Scholes G. u. J. Weiss - Brit. I. Radiol. 27, 47 (1954)
167. Schrader F. u. C. Leuchtenberger Exper. Cell. Res. 1, 421 (1950)
168. Schwartz H., H. P. Riggs, H. E. Glick, C. Mc. Grath, R. Childs, E. Berr u. E. Stone I. Phil Gen. Hosp. 4, 165 (1953)
169. Spear P. G. Brit. Med. Bull. 4, 2 (1946—47)
170. Stoneberg C. A. - I. Biol. Chem. 129 (1939)
171. Taylor H.-E. Call-Intern., C. N. R. S. (1948)
172. Thomson J. F.-Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 80, 268 (1953)
173. Ders. u. E. Mikuta Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 86, 487 (1955)
174. Ders., W. Wallace, M. Tourtellotte, S. Carttar u. B. J. Storer Arch. Biochem. Biophys. 42, 185 (1953)
175. Tellyesniczky K. Artikel „Fixation“ Enxykl. d. mikr. Technik 3. Aufl. Bd. 2, S. 750-85
176. Timofeeff - Ressowsky H. W.
177. Tischer H. u. H. Schuller Strahlenth. 89, 456 (1952)
178. Tompson, Carttar, Tourtellotte: Radiation Res. 1, 165 (1954)
179. Verga V. u. A. Cali Radiotherp. 3, 9 (1954)
180. Voss
181. Walker P. M. - B. u. H. G. Davies, Discuss. Farad. Soc. No. 9 461 (1950)
182. Childs W., M. W. Holt u. C. S. Sommers Amer. I. Clin. Path. 22, 411 (1952)
183. Way J. L., H. G. Mandel u. P. K. Smith Cancer Res. 14, 812 (1954)
184. Werner, Cl. F. Die Dauer der Fixation Z. u. M. Bd. 53, 564-580
185. Ders. Z. Hals-, Nase u. Ohr 35 S. 564-80
186. Weymouth P. P., N. E. Delfel, R. J. Doell, H. L. Steinbock u. H. S. Kaplan I. Nat. Cancer Inst. 15, 981 (1955)
187. Dies.
188. Ders. u. H. Kaplan Cancer Res. 12, 307 (1952)
189. Williams R. B., J. White, J. N. Toal u. J. C. Reid Radiation Res. 3, 358 (1955)
190. Withering A. R. - Genetics 35, 139 (1950)

DRUCK: BUCHDRUCKEREI GEORG GÖBEL, NÜRNBERG

